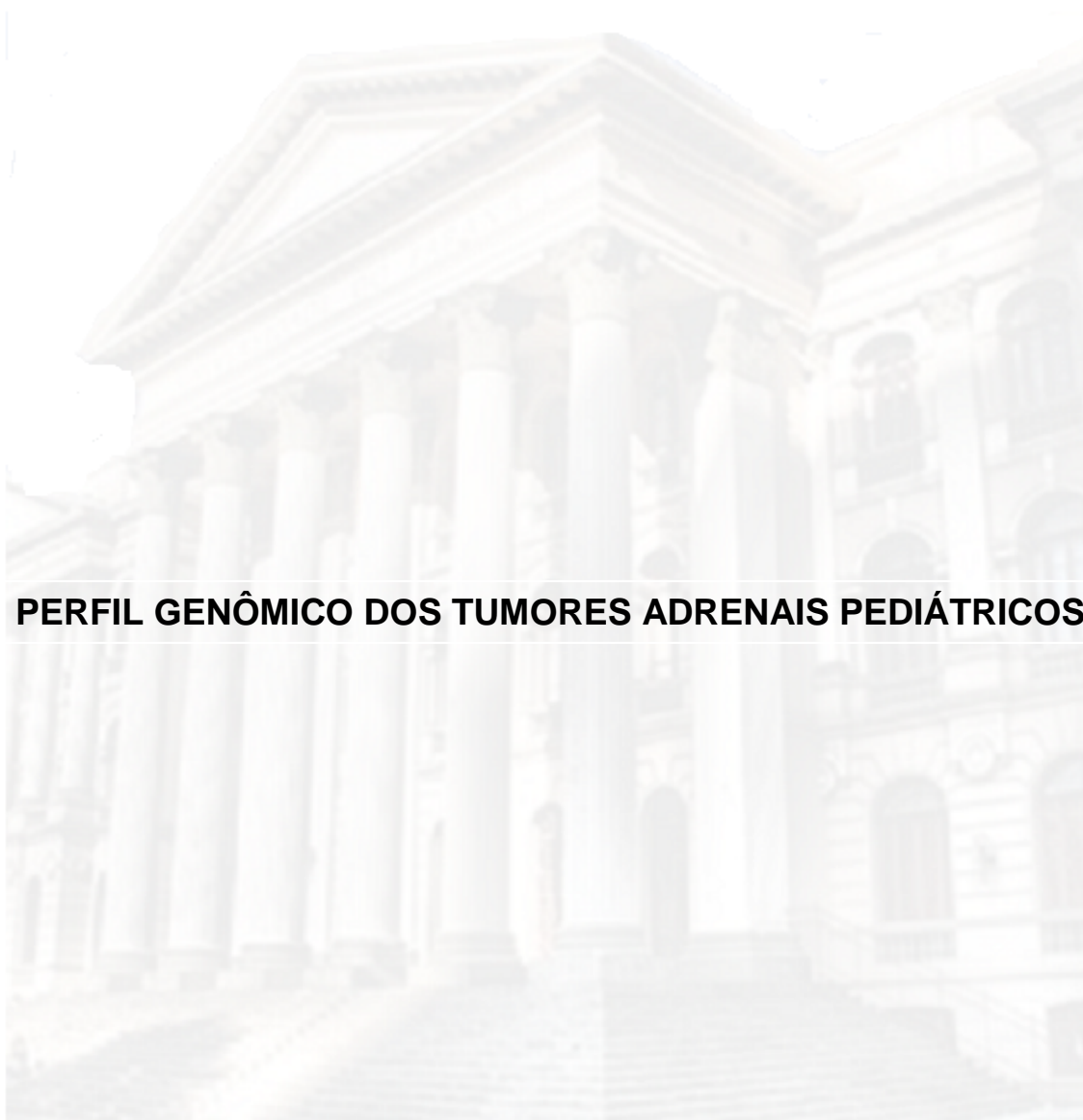


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAUL CORREA RIBEIRO



PERFIL GENÔMICO DOS TUMORES ADRENAIS PEDIÁTRICOS

CURITIBA

2014

RAUL CORREA RIBEIRO

PERFIL GENÔMICO DOS TUMORES ADRENAIS PEDIÁTRICOS

Tese submetida ao
Programa de Pós-Graduação do
Departamento de Genética da
Universidade Federal do Paraná
como requisito parcial a obtenção
do título de Doutor por Notório
Saber.

CURITIBA

2014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **RAUL CORREA RIBEIRO**, para obtenção do título de Doutor em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 21 de novembro de 2014

Doutor Waldir da Veiga Pereira

Universidade Federal de Santa Maria/RS – Membro Titular

Doutor Luiz Fernando Bleggi Torres

Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Doutor Adam Smith

Instituto Pelé Pequeno Príncipe – Membro Titular

Doutor Bonald Figueiredo

Instituto Pelé Pequeno Príncipe – Membro Titular

Doutor Iglênir João Cavalli

Universidade Federal do Paraná – Presidente da Banca

Visto

Profª Dra. Enilze M. S. F. Ribeiro
Vice-Coordenadora do PPG-GEN-UFPR
Matrícula 103446

Professora Doutora **Enilze Maria de Souza F. Ribeiro**
Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

AGRADECIMENTOS

A Gerard P. Zambetti, por auxiliar na coordenação dos trabalhos deste projeto realizado no St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, EUA.

A Gerard P. Zambetti, Jinghui Zhang, Emilia M. Pinto, Xiang Chen, Elaine R. Mardis, Richard K. Wilson, e James R. Downing por terem auxiliado no planejamento dos experimentos.

A Emilia M. Pinto, John Easton, Kristy Boggs, Donald Yergeau, Jinjun Cheng, Troy C. Lund, Jayanthi Manne e Heather L. Mulder por terem executado os experimentos.

A Xiang Chen, David Finkelstein, Zhifa Liu, Jinghui Zhang e Stanley Pounds por terem realizado as análises de bioinformática.

A Emilia M. Pinto, Xiang Chen, John Easton, Stanley Pounds, James R. Downing, Gerard P. Zambetti e Jinghui Zhang por terem auxiliado na análise e apresentação de todos os dados.

A Jesse Jenkins por ter procedido todas as análises histopatológicas.

A Maria J Mastellaro por contribuir com a obtenção de dados clínicos e biológicos.

A Carlos Rodriguez-Galindo, Bonald C. Figueiredo, Michael A. Dyer, Alberto Pappo, Jinghui Zhang, James R. Downing, Emilia M. Pinto, Xiang Chen, Gerard P. Zambetti por terem auxiliado na redação do manuscrito submetido ao periódico Nature Communications.

RESUMO

Os tipos histológicos e localizações dos tumores diagnosticados em pacientes portadores de mutação hereditária no gene *TP53* são semelhantes aos encontrados nos pacientes com mutação esporádica no *TP53*. Entretanto, os pacientes com mutação hereditária tendem a desenvolver os tumores mais precocemente. O tecido adrenocortical é aparentemente muito mais sensível à perda da atividade da proteína p53, especialmente nos primeiros anos de vida quando comparado ao córtex adrenal adulto. Em adição, mais de 50% dos tumores do córtex adrenal (TCA) de crianças apresentam algum tipo de mutação no *TP53*. Células de TCA com mutação no *TP53* apresentam mais perdas e ganhos de cromossomos do que TCA sem mutação no *TP53*. Acredita-se que a mutação isolada no gene *TP53* é insuficiente para o desenvolvimento tumoral, sendo necessário contribuições de outros fatores genéticos e/ou ambientais para o início da tumorigênese. Carcinoma adrenocortical pediátrico (CCA) é um tumor raro, maligno, e com prognóstico reservado.

O objetivo deste trabalho foi analisar 37 TCAs de crianças pelo sequenciamento genômico completo, sequenciamento do exoma e/ou sequenciamento do transcriptoma. O critério de seleção dos TCAs (carcinomas e adenomas) considerou a distribuição dos diferentes tipos histológicos (benigno e maligno), presença ou ausência de mutação no gene *TP53*, TCAs com a mutação *TP53* R337H, ou outras mutações no gene *TP53* com elevada penetrância. A perda de heterozigose (LOH) do braço curto do cromossomo 11 (ch11p) ocorreu em 91% dos casos, e em todos os casos analisados a perda foi do cromossomo materno. O gene *IGF-2*, localizado dentro de um conjunto de genes sob controle de *imprinting* no ch11p, apresentou elevada expressão em 100% dos tumores analisados. Mutações no gene *TP53* em combinação com LOH do cromossomo 17 (ch17) foi observado em 28/37 casos de TCAs (76%), quando comparado com TCAs que apresentaram o *p53* selvagem. LOH dos cromossomos ch11p e ch17 ocorreu no início da tumorigênese, sugerindo serem estes eventos iniciadores da formação tumoral. Outras alterações genéticas encontradas nos TCAs incluem mutações somáticas recorrentes nos genes *ATRX*, *CTNNB1*, e integração do vírus herpes humano-6 (HHV6) na região telomérica do ch11p. O pior prognóstico foi identificado nos pacientes com CCAs que apresentaram mutações no *TP53* e *ATRX* associadas a outras anormalidades genômicas, incluindo as variações estruturais complexas. No conjunto, estes resultados demonstram o caráter, a ordem temporal e o possível significado prognóstico de alterações genéticas fundamentais nos TCAs pediátricos, como também delinearam uma proposta de modelo da tumorigênese no córtex adrenal do grupo pediátrico.

Palavras-chave: Tumor de córtex adrenal; criança; genoma; *TP53*; mutação.

ABSTRACT

The spectrum of tumors in patients with *TP53* germline mutation is similar to that found in sporadic tumors, but inherited tumors tend to develop much earlier. The adrenocortical tissue of younger children are highly sensitive to the loss of p53 activity, much more than the adult adrenal cortex, and over 50% of the adrenocortical tumours (ACT) of children have some kind of *TP53* mutation. ACT cells with *TP53* mutations exhibit more deletions and gains of chromosomes than ACTs without *TP53* mutation. It is believed that cells with *TP53* mutations to undergo transformation require contributions from environmental contaminants and / or other mutations to initiate tumorigenesis. Pediatric adrenocortical carcinoma is a rare malignancy with poor prognosis. Here we analyzed 37 childhood ACTs by whole genome, whole exome and/or transcriptome sequencing. The criteria for selecting ACTs (carcinomas and adenomas) considered the well-known distribution of different ACT types, including benign and malignant tumors, presence or absence of mutations in the *TP53* gene, and also ACTs with the *TP53* R337H mutation or other mutation in the *TP53* gene with higher penetrance. Loss of heterozygosity (LOH) of chromosome 11p occurred in 91% of ACTs and all informative cases selected against the maternal chromosome. *IGF2*, which is located within a cluster of imprinted genes on chromosome 11p, was overexpressed in 100% of the tumors. *TP53* mutations and chromosome 17 LOH with selection against wild-type *TP53* were observed in 28 ACT cases (76%). Copy neutral- LOH of chromosomes 11p and 17 occurred early during tumorigenesis, suggestive of tumor driver events. Additional genetic alterations included recurrent somatic mutations in *ATRX* and *CTNNB1*, as well as integration of human herpesvirus-6 (HHV6) in the telomeric region of chromosome 11p. A very poor outcome was predicted by concomitant *TP53* and *ATRX* mutations and associated genomic abnormalities, including massive structural variations and a high background mutation rate. Collectively, these findings demonstrate the nature, timing and potential prognostic significance of key genetic alterations in pediatric ACT and outline a hypothetical model of pediatric adrenocortical tumorigenesis.

Keywords: Adrenocortical tumour; children; genome, *TP53*; mutation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Associação entre as características moleculares e clínico-patológicas de tumores adrenocorticais pediátricos	34
Figura 2: Mutações somáticas no gene <i>ATRX</i> e análise dos telômeros dos tumores adrenocorticais pediátricos	36
Figura 3: Características histopatológicas e genômicas de TCA TP53 R337H	38
Figura 4: Caracterização de LOH nos cromossomos 11 e 17 em TCA pediátrico ..	40
Figura 5 : Caracterização de MLL e HHV6 (PCR e FISH)	45

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES (APÊNDICE)

Figura Suplementar 1: Espectro de mutações no TCA pediátrico

Figuras Suplementares 2 (a-h): Plotagem das alterações genéticas identificadas em TCAs pediátricos por WGS

Figura Suplementar 3: Mutações no gene TP53 em TCAs pediátricos

Figura Suplementar 4: Status de TP53, CTNNB1 e cromossomo 11p15 em TCA do grupo de validação

Figura Suplementar 5: Distribuição de mutações CTNNB1 em TCAs pediátricos dos grupos WGS e WES

Figura Suplementar 6: Sequenciamento do transcriptoma de genes selecionados na região de imprinting 11p15

Figura Suplementar 7a e 7b: Cronologia da cn-LOH em TCAs pediátricos no grupo de WGS

Figura Suplementar 8a, 8b e 8c: Variações no número de cópias cromossômicas em TCA pediátrico

Figura Suplementar 9: Assinaturas de chromothripsis no TCA pediátrico

Figura Suplementar 10: Assinaturas de kataegis no TCA pediátrico

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES (APÊNDICE)

Tabela Suplementar 1a: Dados clínicos dos TCAs - Coorte WGS

Tabela Suplementar 1b: Dados clínicos dos TCAs - Coorte WES

Tabela Suplementar 1c: Dados clínicos dos TCAs - Coorte de validação

Tabela Suplementar 2a: Dados sobre a coorte WGS

Tabela Suplementar 2b: Dados sobre a coorte WES

Tabela Suplementar 2c: Dados sobre a análise do sequenciamento de RNA

Tabela Suplementar 3a: (não incluída/15 páginas)

Tabela Suplementar 3b: Dados validados na coorte de WES (não incluída/5 páginas)

Tabela Suplementar 3c: Indels nas coortes WGS e WES

Tabela Suplementar 3d: (não incluída/53 páginas)

Tabela Suplementar 4: Genes de fusão funcional detectados por meio do sequenciamento de RNA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT – Adrenocortical Tumor (tumor adrenocortical)

AI - Desequilíbrio alélico

ARG273CYS – Residue change from Arginine (ARG) to Cysteine (CYS) at codon 273 [Mudança do aminoácido arginina (ARG) para cisteína (CYS) no códon 273]

ARG175HIS – Residue change from Arginine (ARG) to Histidine (HIS) at codon 175 [Mudança do aminoácido arginina (ARG) para Histidina (HIS) no códon 175]

ARG175LEU – Residue change from Arginine (ARG) to Leucine (HIS) at codon 175 [Mudança do aminoácido arginina (ARG) para Leucine (LEU) no códon 175]

APAF1 – Apoptotic protease activating factor 1 (Fator apoptótico de ativação de protease)

ATRX – Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (Síndrome alfa talassemia / retardo mental ligada ao X)

ATM – Ataxia Telangiectasia Mutated (Ataxia Telangiectasia Mutado)

BUB1 – Budding Uninhibited By Benzimidazoles 1 (Brotamento Desinibido por Benzimidazóis 1)

BMR – *Basic metabolic rate* (Taxa metabólica basal)

BW - Síndrome de Beckwith-Wiedemann

CCA – Carcinoma de córtex adrenal.

CCCTAA – DNA motif: cytosine, cytosine, cytosine, thymine, adenine, adenine (Sequência de DNA: citosina, citosina, citosina, timina, adenina, adenina)

CCNB1 – Cyclin B1 (Ciclina B1)

CDS - coding sequence (sequência codificadora)

cDNA - DNA complementar

CDKN1C – Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C (Inibidor de quinase-dependente de ciclina 1C)

CN-LOH – *Copy neutral loss of heterozygosity* (Cópia neutra da Perda de heterosigose)

CNA – *Copy number alteration* (Alterações do número de cópias).

COG – *Children's Oncology Group* (Grupo de Oncologia Infantil).

CONSERVING – *Copy Number Segmentation by Regression Tree In Next-Gen sequencing* (Segmentação do número de cópias pela árvore de regressão no sequenciamento Next-Gen)

CPC – Carcinoma do plexo coróide.

CTNNB1 – Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1 [Catenina (proteína associada à caderina), beta 1]

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-diamidino-2-fenilindol)

DAXX – death-domain associated protein (Proteína associadas ao domínio da morte)

DBD – *DNA-binding domain* (domínio de ligação ao DNA).

DNA – *Desoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico).

DNAase I – Desoxirribonuclease I

ESPL - Enhancer of split complex (Ativador do complexo de divisão)

FASTQ – File format to store short sequence reads (36 to 250 base pairs) [Formato de arquivo para armazenar pequena sequência de bases (36-250 pares)]

FCS – Fetal calf serum (Soro fetal bovino)

FISH – Fluorescence in situ hybridization (Hibridização *in situ* fluorescente).

GISTIC – *Cancer Program Resource Gateway* (Programa de Recursos Gateway para câncer)

H19 – H19, Imprinted Maternally Expressed Transcript [fator H19, transcrito Expresso sob controle do alelo materno (*imprinting* materno)]

H&E – Coloração Hematoxina & Eosina

HHV6 – Virus herpes 6 humano

IGF - *Insulin-like Growth Factor* (fator de crescimento semelhante à insulina).

IGF-1R - *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor* (receptor 1 do fator de crescimento semelhante à insulina)

IGF-2 – *Insulin-like Growth Factor 2* (fator de crescimento semelhante à insulina 2)

Indel - Short insertions and deletions (inserções e deleções curtas)

IPACTR – *The International Pediatric Adrenocortical Tumor* (Registro Internacional de Tumor de Córtex Adrenal Pediátrico).

INHA – Alfa-Inibina.

KCNQ1 – Potassium Voltage-Gated Channel, KQT-Like Subfamily (Canal de potássio Voltagem-dependente, Subfamília KQT-símile)

LFS – *Li-Fraumeni syndrome* (Síndrome de Li-Fraumeni)

LFL – *Li-Fraumeni-like* (Síndrome de *Li-Fraumeni-símile*).

LOH – *Loss of Heterozygosity* (Perda de heterozigose).

MAF – Frações de alelos mutantes.

MCM2 – Minichromosome Maintenance Complex Component 2 (Componente 2 do complexo de manutenção do minicromossomo)

MDM2 – Human homolog of mouse double minute = E3 Ubiquitin Protein Ligase (Duplo minuto homólogo humano de camundongo 2 = Proteína ligase ubiquitina E3)

MDM4 – Human homolog of mouse double minute = E3 Ubiquitin Protein Ligase (Duplo minuto homólogo humano de camundongo 2 = Proteína ligase ubiquitina E3)

MLL – Lysine (K)-Specific Methyltransferase 2A, myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia gene [Lisina (K) - Metiltransferase específica 2A, mielóide / linfóide ou gene da linhagem mista da leucemia.

NCI – *National Cancer Institute* (Instituto Nacional do Câncer).

P14ARF – Alternate reading frame (ARF) product of the CDKN2A locus P53 – [Quadro de leitura alternativo (ARF) produto do CDKN2A no locus P53 CDKN2A]

PCR – Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase).

pH – Potencial Hidrogeniônico

PTTG1 – Pituitary Tumor-Transforming 1 (fator de transformação da pituitária 1)

R175H – Residue change from Arginine (R) to Histidine (H) at position 175 [Mudança do aminoácido arginina (ARG) para histidina (HIS) no códon 175]

R273C – Residue change from Arginine (R) to Cysteine (CYS) at position 273 [Mudança do aminoácido arginina (ARG) para cisteína (CYS) no códon 273]

R337H – Residue change from Arginine (R) to Histidine (H) at position 337 [Mudança do aminoácido arginina (ARG) para histidina (CYS) no códon 337]

RNA_m – Ribonucleic acid messenger (Ácido ribonucleico mensageiro)

RNA-Seq - Sequenciamento de RNA.

SF-1 – Steroidogenic Factor 1 (fator esteroideogênico 1).

SGOL – Segment gain or loss (Segmento de ganho ou perda)

SJACT – Série de pacientes do registro do SJCRH (IPACTR)

SJACT001 – Paciente número 1

SJACT002 – Paciente número 2

SJACT003 – Paciente número 3

SJACT004 – Paciente número 4

SJACT005 – Paciente número 5

SJACT007 – Paciente número 7

SJACT008 – Paciente número 8

SJACT017 – Paciente número 17

SJACT021 – Paciente número 21

SJACT062 – Paciente número 62

SJACT063 – Paciente número 63

SJACT069 – Paciente número 69

SNP - Polimorfismo de um nucleotídio

SNP309G – Polimorfismo de um nucleotídio (mudança de T para G) no segundo promotor (P2) do gene MDM2 humano

SNVs – Single nucleotide variants (Variantes de um nucleotídio)

SSC 2X – Citrato de salina-sódica, 2X

SVS- Variantes estruturais

TCA – Tumor de córtex adrenal

Tier – Classificação por nível (cada nível representa um tipo de mutação)

Tier 1 (nível 1): mutações que ocorrem em sequências codificadoras, locais de splicing e RNAs não-codificantes. Incluem mutações que mudam o aminoácido ou não mudam o aminoácido (=silenciosas)

Tier 2 (nível 2): mutações que alteram sequências conservadas ou reguladoras

Tier 3 (nível 3): mutações em porções únicas não-codificantes do genoma

Tier 4 (nível 4): mutações em regiões repetitivas não codificantes (todas as outras SNVs)

TMB – Taxa de mutação de base

TP53 – Tumor protein 53

TPX2 – Microtubule-Associated Protein

TTAGGG – Sequência de DNA: timina, adenina, guanina, guanina, guanina

U94 – Proteína U94

UPD – Indicativo de dissomia uniparental

UTR - untranslated region (região não codificadora)

WGA - *Whole Genome amplification* (Amplificação completa do genoma).

WGS – *Whole Genome Sequencing* (sequenciamento completo de genoma).

WSE - *Whole exome sequencing* (sequenciamento completo dos exomas).

WT – Wild-type (gene ou proteína selvagem)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVO GERAL	17
1.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Mutações no gene TP53 associadas com outras alterações genéticas	18
2.2	Fatores colaboradores no TCA Pediátrico	26
3	METODOLOGIA	30
3.1	Sequenciamento completo do genoma (WGS)	30
3.2	Sequenciamento completo dos exomas (WES)	31
3.3	Validação do sequenciamento de DNA	32
3.4	Sequenciamento do transcriptoma	32
3.5	Análise GISTIC	33
3.6	Perfil de cn-LOH	33
3.7	Conteúdo de DNA telomérico e telômero FISH	33
3.8	Análise de marcadores microssatélites no cromossomo 11p	34
3.9	Mutações no <i>TP53</i> e em outros genes	34
3.10	Integração cromossômica – HHV-6	34
4	RESULTADOS	35
4.1	Análise do genoma e transcriptoma	37
4.2	Mutação no <i>TP53</i>	40
4.3	Mutações somáticas <i>ATRX</i>	44
4.4	Mutações somáticas β -catenin	44
4.5	Classificação genômica do TCA	45
4.6	Perda de Heterozigose dos cromossomos 11 e 17	46
4.7	Cronologia de cn-LOH dos cromossomos 11 e 17	47
4.8	Integração cromossomal do herpesvírus humano 6	47
4.9	Outros eventos genéticos	49
5	DISCUSSÕES	50
6	CONCLUSÕES	53

1 INTRODUÇÃO

Muitas pesquisas moleculares e celulares relacionadas ao tumor de córtex adrenal (TCA) foram realizadas nos últimos 20 anos no St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, EUA), no Sul e Sudeste do Brasil, e em outros países. Os avanços metodológicos, a preços cada vez mais baixos, permitiram desenvolver trabalhos que antes eram difíceis e demandavam muito tempo. O presente estudo é um exemplo da combinação dessas tecnologias com a colaboração essencial de especialistas em áreas muito específicas, sobretudo da bioinformática.

Foi proposto que a elevada incidência dos TCAs de crianças do Estado do Paraná é decorrente da elevada prevalência da mutação *TP53* R337H na população (RIBEIRO et al., 2001), depois confirmada em pacientes do Estado de São Paulo (LATRONICO et al., 2001). O mecanismo inicial proposto sobre a perda de função desta proteína p53 R337H associa temperatura e pH elevados (DIGIAMMARINO et al., 2002), sugerindo um modelo de uma possível relação entre a atividade de um alelo do *TP53* e fatores ambientais. A origem desta mutação foi descrita como efeito fundador (PINTO et al., 2004) e, de fato, até a presente data nunca foi identificada uma mutação *TP53* R337H *de novo* em crianças do Sul e Sudeste do Brasil. A elevada incidência do TCA, 15 a 18 vezes maior em crianças do Sul e Sudeste do Brasil (PIANOVSKI et al., 2006), foi confirmada recentemente no screening neonatal realizado no Estado do Paraná entre 2005 e 2011 (CUSTÓDIO et al., 2013), e no screening neonatal na região metropolitana da cidade de Campinas, Estado de São Paulo (em andamento, comunicação pessoal). A penetrância deste alelo R337H para determinado tipo de tumor depende muito da população estudada, de forma que em coorte de base hospitalar a penetrância para o TCA pediátrico foi 10% (FIGUEIREDO et al., 2006), enquanto na população geral foi 2,7% (CUSTÓDIO et al., 2013). Nestes últimos 2 estudos, não foi considerado o aspecto ambiental, nem a possibilidade de haver influência positiva ou negativa de outras alterações genéticas associadas.

O grande desafio das pesquisas recentes foi a demonstração de que é possível identificar o TCA (através do screening neonatal para *TP53* R337H, exames periódicos do hormônio sulfato de dehidroepiandrosterona, e ultrasonografia abdominal) antes da criança apresentar os sinais e sintomas característicos de

doença avançada, ou seja, antes do TCA atingir um tamanho que impossibilite ressecção completa ou haja necessidade de tratamento complementar com quimioterapia e mitotano (CUSTÓDIO et al., 2013). O segundo desafio ainda não foi plenamente concluído; ainda não foi identificado um grupo de marcadores moleculares prognósticos que pudessem prever o grau de malignidade e/ou a resposta terapêutica destes tumores.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de contribuir com os dois desafios aqui citados, identificando marcadores relacionados à tumorigênese, ao crescimento e malignidade do TCA. Por exemplo, o aconselhamento genético e a decisão sobre os intervalos de exames durante o seguimento ambulatorial de uma criança com mutação *TP53* R337H, poderiam ser baseados na presença ou ausência de outros marcadores que possam estimar melhor a possibilidade de aparecimento do TCA, e com isto ser possível estabelecer subgrupos de pacientes que necessitam (ou não) de atenções diferenciadas, e em intervalos de tempo mais curtos.

Nossa hipótese é que "Alterações genéticas, herdadas e/ou adquiridas, se somam à mutação germinativa no gene *TP53* e contribuem para a gênese, progressão, e prognóstico do carcinoma de córtex adrenal pediátrico (CCA)."

1.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as alterações genômicas que se relacionam com a formação e/ou prognóstico do CCA em crianças.

1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Obter as sequências genômicas completas de amostras pareadas de sangue periférico e de tumores de córtex adrenal de crianças (n=37);

Identificar genes ou variações genéticas associados ao tumor de córtex adrenal pediátrico;

Identificar alterações genômicas relacionadas com o prognóstico dos CCAs de crianças.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MUTAÇÕES NO GENE *TP53* ASSOCIADAS COM OUTRAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS

As neoplasias pediátricas representam cerca de 1% a 2% de todos os tumores malignos humanos (Altekruse et al., 2010). Como um grupo, as mutações somáticas no *TP53* estão entre as alterações genéticas mais comumente observadas em cânceres humanos e ocorrem em aproximadamente 50% dos tumores esporádicos (Strong et al., 1992; Birch et al., 1998; Bennett et al., 1999). Muitos estudos tem revelado a existência de diversos mutantes de *TP53* herdados, que resultam em diferentes níveis de atividade supressora de tumor, os quais se correlacionam com o risco de câncer em termos de penetrância, idade de surgimento da neoplasia e tipos de tumor (revisado por Pinto et al., 2011). O tecido adrenocortical infantil é altamente sensível a perda de atividade da p53, aparentemente muito mais que o córtex adrenal adulto.

Embora o tipo e localização dos tumores observados em portadores de uma mutação germinativa no *TP53* seja semelhante ao encontrado nos tumores esporádicos, esses pacientes com mutação hereditária tendem a desenvolver tumores muito mais precocemente quando comparados com pacientes com o mesmo tipo de cancer e mutação esporádica do *TP53*. A antecipação do desenvolvimento de tumores neste grupo de pacientes, particularmente em certos tecidos, sugere que as células com mutações no *TP53* necessitam de ter contribuições de outros fatores genéticos e/ou ambientais para iniciar a tumorigênese. Postula-se que polimorfismos genéticos constitucionais, mutações em outros genes, e mecanismos epigenéticos possam contribuir com a perda da atividade do p53 e promover o desenvolvimento tumoral. Compreender as mudanças genéticas em TCAs fornece os indícios essenciais para a sua etiologia, em especial o equilíbrio entre fatores genéticos versus ambientais na causa da doença. Muitos estudos celulares e moleculares de p53 mutantes, e de suas vias associadas, foram realizados no St. Jude Children's Hospital, contribuindo para

conhecer os mecanismos de condução da tumorigênese adrenocortical e para o desenvolvimento de terapias mais eficazes para esses pacientes.

A proteína p53, codificada pelo gene *TP53* humano localizado no braço curto do cromossomo 17 (Ch 17p13.1), funciona primariamente como um factor de transcrição. Quatro monômeros unidos formam uma unidade tetramérica ativa que é essencial para a manutenção do crescimento e sobrevivência de células normais. O estresse celular causado por agentes que danificam o DNA, a desregulação de oncogenes ou outras injúrias ambientais, tais como a hipóxia, podem ativar a p53, resultando na parada do ciclo celular, senescência celular e/ou apoptose. A p53 pode também afetar vias glicolíticas, promover o reparo de DNA, angiogênese, longevidade e envelhecimento (Vousden et al., 2007). Após sua síntese, a p53 sofre modificações pós-translacionais que resultam em estabilização, ativação e induz a expressão de seus genes-alvo (Brosh e Rotter, 2009). Estes genes respondem à ação da p53 e são diferencialmente regulados: dependendo do contexto celular, a extensão do dano celular, e vários outros parâmetros ainda não identificados (Oren, 2003).

Durante a tumorigênese, fortes pressões seletivas colaboram para inativar a p53 (Vousden e Lu, 2002). Cerca de 50% de todos os tumores humanos possuem mutações intrínsecas no *TP53*, enquanto que o restante dos casos adquirem outras alterações genéticas ou epigenéticas que eventualmente comprometem a função da p53 (Weisz et al., 2007). A maioria das mutações no *TP53* associadas com tumores possuem substituições de um único nucleótido. A grande maioria destas mutações pontuais estão agrupadas no domínio de ligação ao DNA (DBD), e resultam na expressão de uma proteína mutante com mudança de um aminoácido e que é deficiente na ligação à sequência específica do DNA, na transativação e na inibição do crescimento (Yan et al., 2010). Além disso, a p53 pode ser funcionalmente inativada através da perda de indutores a montante (ATM, p14ARF), a jusante (caspase 9, APAF1), ou pela super-exposição aos reguladores negativos (MDM2, MDM4, papiloma vírus humano E6) (Zambetti, 2007).

Aproximadamente 80% das mutações no *TP53* ocorrem no DBD (Petitjean et al., 2007), com a maioria ocorrendo em 6 codons, denominados “*hot spots*” (175, 245, 248, 249, 273, e 282). Estes códons são responsáveis por cerca de 40% de

todas as mutações *missense* (= troca de base resultando em troca de aminoácido) no *TP53* e são naturalmente selecionados durante a tumorigênese devido aos seus efeitos deletérios sobre a capacidade da p53 em se ligar ao DNA e regular a transcrição (Weisz et al., 2007). A maioria das proteínas p53 *missense* são estáveis e acumuladas em níveis elevados nos tumores humanos (Vousden e Lu, 2002). Foi demonstrado que algumas p53 mutantes exibem um fenótipo dominante negativo pela ligação do monômero p53 normal (expresso pelo alelo selvagem), resultando em heterodímero e tetrâmero inativos (Milner et al., 1991; de Vries et al., 2002). Consistentemente com estes achados, foram descritos cânceres humanos com uma p53 mutante e uma p53 selvagem (Russell-Swetek et al., 2008). Da mesma forma, camundongos que são heterozigotos para uma mutação de um único nucleotídeo no gene *TP53* com efeito dominante negativo, desenvolvem tumores sem a perda do alelo *TP53* selvagem (Liu et al., 2000). A inativação parcial da função da proteína p53 selvagem pela p53 mutante pode proporcionar alguma vantagem seletiva durante a progressão tumoral.

A atividade supressora de tumor da p53 é limitada principalmente pela MDM2, que se liga e bloqueia o terminal amina da p53. Consequentemente, a MDM2 inibe a função de transcrição da p53 e, por meio da atividade da ubiquitina ligase E3, a p53 é sinalizada para a degradação proteossomal. A transcrição da MDM2 pode ser direta e positivamente regulada pela p53 (Momand et al., 1992; Haupt et al., 1997). A importância dessa interação na regulação da supressão tumoral dependente de p53 é destacado pelos seguintes achados: 1) Estudos em modelos animais têm demonstrado que a letalidade embriônica de camundongos com perda de MDM2 pode ser totalmente resgatada por exclusão da p53; 2) camundongos MDM2 transgênicos são propensos ao desenvolvimento tumoral; 3) *MDM2* é frequentemente amplificado e super expresso em tumores humanos que retêm o alelo selvagem *TP53*; e 4) Nutlin, um inibidor de MDM2, pode reativar a função da p53 em tumores que expressam o alelo selvagem *TP53* (Wade et al., 2009).

Um polimorfismo de um único nucleótido (SNP) no promotor de *MDM2*, no nucleótido 309T>G (rs2279744), demonstrou melhorar a transcrição de MDM2, resultando no acúmulo da proteína MDM2 e, consequentemente, a atenuação da função da p53 (Bond et al., 2004). De acordo com estes resultados, o alelo *MDM2*

SNP309G está associado com a idade precoce de surgimento dos tumores em pacientes com síndrome de Li-Fraumeni (LFS) (Bougeard et al., 2006).

A inativação da p53 em cânceres humanos pode também ocorrer através da amplificação e super expressão de *MDM4*, o qual compartilha homologia com *MDM2* (Shvarts et al., 1996; Reed et al., 2010). O *MDM4* está geneticamente amplificado em um subgrupo de carcinomas de mama, cólon, pulmão, gliomas, e cerca de 65% das crianças com retinoblastoma (Laurie et al., 2006). Um consenso geral está surgindo de que, além da Nutlina e compostos derivados, um inibidor específico de *MDM4* deverá ser desenvolvido para o tratamento eficaz do retinoblastoma e outros tumores que mantêm a expressão da p53 selvagem (Reed et al., 2010).

Mutações hereditárias do *TP53* causam um tipo raro de predisposição ao câncer familiar conhecida como síndrome de Li-Fraumeni (LFS). Neste grupo de pacientes os membros de uma mesma família podem apresentar diferentes tipos de tumores e em uma ampla faixa etária, inclusive durante a infância. Esta síndrome é caracterizada pelos seguintes critérios: um probando com sarcoma diagnosticado em idade inferior a 45 anos; um parente de primeiro grau com menos de 45 anos e diagnóstico de qualquer tipo de câncer; além de mais um parente de primeiro ou de segundo grau da mesma linhagem com qualquer tipo de câncer antes dos 45 anos, ou com sarcoma em qualquer idade (Li et al., 1998). Indivíduos com LFS têm um risco maior para câncer em idades mais jovens do que a população em geral. Estima-se que 50% das malignidades associadas a SLF ocorrem antes de completar 30 anos de idade (Lustbader et al., 1992). LFS está associada ao aumento da susceptibilidade a diversas malignidades, como sarcomas em tecidos moles, osteossarcomas, tumores cerebrais, carcinomas do plexo coróide (CPC) e TCA pediátrico, bem como a múltiplos outros tipos de tumores (Gonzalez et al., 2009). Em particular, as mulheres com LFS têm um risco significativamente elevado de câncer de mama na pré-menopausa (Olivier et al., 2003). Na avaliação de famílias para LFS, a idade jovem no momento do diagnóstico pode ser uma variável tão importante quanto o tipo específico de malignidade.

Esquemas de classificação clínica foram descritos, que caracterizam a síndrome *Li-Fraumeni-símile* (LFL) como tendo características de LFS sem cumprir totalmente suas rigorosas exigências (Birch, 1994). Critérios adicionais estabelecidos por Chompret e colaboradores permitem a possibilidade de um

probando com um tumor relacionado a LFS, mas com um histórico familiar negativo de câncer (Chompret et al., 2001).

Até o momento, *TP53* é o único gene conhecido fortemente associado com LFS e LFL. O teste clínico envolve a análise da sequência de toda a região codificadora do *TP53*. Este método detecta cerca de 95% das mutações no *TP53*, a maioria das quais são mutações *missense* que alteram um único códon. Estima-se que 70% dos indivíduos com LFS e 8 a 22% dos indivíduos com LFL têm mutações *TP53* detectáveis (Birch et al., 1994; Varley et al., 2003). A frequência de mutações *de novo* na LFS varia entre 7% e 20% (Gonzalez et al., 2009). Não é muito surpreendente que as mutações *TP53* herdadas associadas com LFS estejam localizadas nos mesmos locais ("*hot spots*") encontrados em tumores esporádicos. Uma das mutações hereditárias mais comuns no *TP53* é a Arg175His. Este mutante não consegue dobrar-se corretamente, ligar-se ao DNA, ativar a transcrição, ou suprimir o crescimento celular. Portadores desta mutação, que é considerada altamente penetrante, têm maior risco para desenvolver câncer em idades precoces (Zambetti, 2007).

Em comparação com a incidência de câncer em adultos, os tumores pediátricos são raros, e representam 1% a 2% de todos os casos de câncer nos Estados Unidos. No entanto, o câncer é a principal causa de morte relacionada a doenças em crianças (Jemal et al., 2003). Tumores infantis compreendem tipos diversos de malignidades com incidências variando ao redor do mundo de acordo com idade, sexo, etnia e geografia. Tais fatores podem fornecer importantes informações sobre a etiologia do câncer (Munir et al., 1996).

Os TCAs da infância são neoplasias raras geralmente relacionadas a uma mutação germinativa do gene *TP53* (supressor tumoral). A grande variação fenotípica (tipo, penetrância, malignidade e idade de aparecimento dos tumores), entre os mais de 300 tipos de mutações já descritas para o gene *TP53* em humanos, revelou um spectrum sindrômico bastante interessante, variando entre a clássica síndrome de Li-Fraumeni (LFS) até formas clinicamente menos graves [LFS-like (LFL)], ou que não preenchem os critérios de LFL (Malkin et al., 1990; Birch, 1994; Birch et al., 1994; Munir et al., 1996; Li et al., 1998; Gonzalez et al., 2009; Pinto et al., 2011B).

O TCA pediátrico é geralmente maligno e raro, mas sua incidência é 15 a 18 vezes maior nos Estados do Paraná, São Paulo e sul de Minas Gerais (Marigo *et al.*, 1969; Pianovski *et al.*, 2006; Seidinger *et al.*, 2011; Custódio *et al.*, 2013). Descobriu-se que a mutação *TP53* R337H (herdada dos pais) é responsável pela elevada incidência do TCA (Ribeiro *et al.*, 2001), que está associada a outros tipos de câncer em familiares (Figueiredo *et al.*, 2006; Custódio *et al.*, 2013) e que é responsável pela elevada incidência do carcinoma de plexo coróide (Custódio *et al.*, 2011; Seidinger *et al.*, 2011). Porém a proporção de TCA em adultos portadores desta mutação é muito mais baixa do que em crianças (Latrônico *et al.*, 2001; Custódio *et al.*, 2012, 2013).

A mutação R337H reduz a estabilidade do tetrâmero de p53 quando exposto a pH elevado e em temperatura supra-fisiológica (DiGiammarino *et al.*, 2002), e já era conhecido que as propriedades de transcrição da proteína R337H (usando cDNA) não estavam alteradas em ensaios de ativação de gene repórter em condições fisiológicas (Ribeiro *et al.*, 2001).

O TCA pediátrico ocorre com uma incidência estimada de 0,3 por milhão de indivíduos com menos de 15 anos nos Estados Unidos e Europa. O TCA está associado com hemi-hipertrofia isolada ou síndrome de Beckwith-Wiedemann (Teinturier *et al.*, 1999) e raramente ocorre em crianças com Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (Langer *et al.*, 2002). No entanto, o TCA pediátrico pode também ser o primeiro evento em uma família com uma mutação germinativa no *TP53* e LFS (Li *et al.*, 1998). As crianças com TCA normalmente apresentam sintomas relacionados com a produção excessiva de esteróides do córtex adrenal, sendo a virilização (70-80%) e a síndrome de Cushing (20-30%) as manifestações endócrinas mais comuns. O estágio da doença, o qual inclui o tamanho do tumor, é o mais importante fator prognóstico. Os pacientes com doença residual após a ressecção incompleta do tumor ou doença metastática têm um prognóstico sombrio (Michalkiewicz *et al.*, 2004).

O Registro Internacional de Tumor Adrenocortical Pediátrico (IPACTR) foi fundado por Raul Correa Ribeiro, no St. Jude Children's Research Hospital, onde são coletadas informações clínicas e amostras biológicas, incluindo sangue e tumor. O perfil genético dos TCAs registrados no IPACTR mostra que aproximadamente 75% dos TCAs são positivos para mutações no *TP53* (8% somáticas e 92%

germinativas) (Ribeiro et al., 2012). Em uma coorte com 48 TCAs, foram detectadas 23 mutações independentes no *TP53* dentro e fora do DBD, e destas apenas 3 tipos de mutações foram detectadas mais de uma vez (Arg175His, Arg273Cys e Arg337His). West e colaboradores (West et al., 2006) também identificou uma nova variante na linhagem germinativa do *TP53*, Arg175Leu, cuja família não é propensa ao câncer, nem demonstra características de LFS. *In vitro*, o *TP53* mutante Arg175Leu exibiu atividade supressora de tumor intermediária na regulação da transcrição, formação de colônias e apoptose, quando comparado ao tipo selvagem e ao mutante *TP53* Arg175His, que é uma mutação bastante comum. Estes resultados sugerem que Arg175Leu retém atividade suficiente para suprimir o aparecimento de outros tumores, mas não o TCA. Portanto, nem todas as mutações no *TP53* são funcionalmente equivalentes, e a natureza bioquímica do mutante pode influenciar significativamente os achados clínicos pertinentes (Zambetti et al., 2007; West et al., 2006).

O TCA pediátrico é frequentemente diagnosticado em crianças de famílias com LFS e mutações no *TP53* de alta penetrância. No entanto, há evidências crescentes de que mutações no *TP53* de baixa penetrância aumentam a predisposição para o TCA na infância (Varley et al., 1999). A predisposição para TCA infantil no Sul do Brasil está associada à mutação germinativa *TP53* Arg337His de baixa penetrância (Ribeiro et al., 2001). Esta mutação encontra-se dentro do domínio de tetramerização da p53 (aminoácidos 336-353). Especificamente, a arginina 337 de uma subunidade forma uma ponte salina com o aspartato 352 no monômero correspondente e estabiliza o complexo. Os estudos estruturais demonstram que o mutante *TP53* Arg337His é instável e não dimeriza eficientemente em um pH fisiológico *in vitro* (Ribeiro et al., 2001; DiGiammarino et al., 2002). Por outro lado, verificou-se que exibe atividade semelhante ao *P53* selvagem quando expresso ectopicamente em fibroblastos e células de osteossarcoma sem o *P53* selvagem (Ribeiro et al., 2001). Estas observações poderiam explicar a falta de associação de *TP53* Arg337His com LFS. Em contraste, a substituição de cisteína no códon 337 tem achados bioquímicos e clínicos muito diferentes (Lomax et al., 1998). A proteína mutante p53 Arg337Cys demonstra uma estrutura diferente, independente do pH, e exibe apenas atividades biológicas parcial (Davison et al., 1998).

De acordo com esta perda significativa de atividade funcional, portadores de uma mutação germinativa no *TP53* Arg337Cys são suscetíveis a vários tipos de tumores, incluindo o câncer de mama (Lomax et al., 1998). Portanto, na maioria dos casos, a mutação Arg337His no *TP53* tem um impacto significativamente menos grave na predisposição ao tumor que Arg337Cys, e esta diferença se correlaciona com o grau relativo de atividade, o qual pode ser medido em laboratório. Estas observações suportam o conceito de que as mutações em um único nucleotídeo, dependendo do aminoácido substituído, têm diferentes consequências sobre a estrutura, a função, e o grau de atividade da p53 e que, por sua vez, afeta a suscetibilidade ao tumor (Zambetti et al., 2007; Pinto et al., 2011A, 2011B).

O panorama genômico do TCA é significativamente diferente entre TCA com e sem mutação no *TP53*, e demonstra pequenas diferenças entre TCA com mutação no DBD e o TCA com a mutação *TP53* R337H (Letouzé et al., 2012). Estes autores identificaram perdas e ganhos cromossômicos em TCAs, com ou sem a mutação no gene *TP53*. Os TCAs de pacientes brasileiros portadores da mutação germinativa de baixa penetrância, *TP53* R337H, apresentaram perdas e ganhos semelhantes aos de TCAs presentes em indivíduos de outros países com mutações na região de domínio de ligação ao DNA com maior penetrância. Estes dois grupos de TCAs apresentam maiores perdas e ganhos em relação aos TCAs sem mutação no gene *TP53*. Desta forma, mudanças importantes no genoma do TCA, indiretamente causadas por mutações no *TP53*, podem contribuir significativamente para agravar o prognóstico da doença. Por isso, no presente trabalho foi considerado adequado agrupar e avaliar os pacientes de acordo com a presença ou ausência de mutação no *TP53*.

Além de apresentar o perfil genômico do TCA de crianças com base na presença ou ausência de mutações no *TP53*, é importante também definir os grupos com base no prognóstico, e assim avaliar se as combinações genéticas observadas podem estar associadas com características clínico-patológicas de um estadió avançado. A dificuldade no planejamento e aconselhamento genético das crianças com a mutação *TP53* R337H, e mais especificamente, quanto a orientação do seguimento ambulatorial, em relação a necessidade de intervalos mais ou menos frequentes, deve-se ao fato de os portadores da mutação *TP53* R337H observada

no sul e sudeste do Brasil se apresentam em 4 grupos de risco distintos (elevado, médio, baixo e muito baixo) (Figueiredo et al., 2006; Custódio et al., 2013). Uma das alternativas para identificar o grupo de risco seria investigar se haveria outras alterações genéticas na linhagem germinativa, herdadas juntas ou não à mutação *TP53* R337H. Por outro lado, a definição de prognóstico conta com uma base de dados clínico-patológicos bastante rica, onde se acrescenta também particularidades das alterações genéticas acumuladas.

Estudos detalhados de famílias com essa mutação também revelaram uma maior incidência de carcinoma de plexo coróide em crianças (Seidinger et al., 2011; Custódio et al., 2011) e tumores de mama e estômago em adultos jovens (Assumpção et al., 2008; Custódio et al., 2013). A mutação *TP53* Arg337His também foi observada em 7% dos osteossarcomas pediátricos no sul do Brasil (Seidinger et al., 2011; Oliveira et al., 2007). Esta frequência é muito maior do que a relatada para a população em geral da região (0,3%) e é maior do que a relatada para pacientes norte-americanos com osteossarcoma que tiveram qualquer mutação *TP53* constitucional (3%) (McIntyre et al., 1994). Estes resultados indicam a existência de outros fatores colaboradores que poderiam influenciar na susceptibilidade ao tumor na presença de *TP53* Arg337His (Pinto et al., 2011A).

Embora seja reconhecido que os indivíduos com certas mutações no *TP53* (por exemplo, Arg175His) tenham alto risco para o câncer em idades precoces e tumores múltiplos, este não é o caso da Arg337His. Na verdade, muitos portadores desta mutação permanecem assintomáticos (Ribeiro et al., 2001; Figueiredo et al., 2006; Custódio et al., 2013.). A penetrância incompleta da *TP53* Arg337His em TCA pediátrico (2%-10% dos portadores desenvolvem a doença) pode estar relacionada à sua incapacidade de agir como um regulador dominante negativo do alelo p53 selvagem. Isto é consistente com quase 100% dos casos de TCA que sofrem LOH pela deleção do alelo p53 selvagem (Ribeiro et al., 2001; Seidinger et al., 2011; Pinto et al., 2005).

Estudos moleculares identificam o mesmo haplótipo para o locus *TP53* em indivíduos portadores da mutação Arg337His, indicando uma origem comum para esta alteração (efeito fundador) (Pinto et al., 2004). A maioria da população da região sul do Brasil é de origem Européia (portugueses, italianos, espanhóis e alemães) com influência indígena entre os brasileiros nativos e africanos (Parra et

al., 2003). A elevada incidência de TCA em pacientes desta região é, por conseguinte, explicada pela presença da mutação Arg337His na linhagem germinativa, que foi provavelmente herdada de um fundador em comum (Pinto et al., 2004). No entanto, Arg337His tem sido detectada em casos isolados de TCA fora do Brasil, mas ainda não foi identificado qual elo entre a mutação *TP53* R337H comum no Brasil e *TP53* R337H identificada em poucos indivíduos de outros países.

2.2 FATORES COLABORADORES NO TCA PEDIÁTRICO

Os fatores adicionais que têm sido implicados no TCA incluem defeitos de *imprinting* (silenciamento) e a super expressão do gene (*IGF-2*) que codifica o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2. O perfil de expressão genética do TCA humano esporádico revelou uma desregulação da região 11p15.5, e vários estudos têm demonstrado ser o *IGF-2* o único transcrito com elevada expressão, entre 80% e 90% dos TCA (Giordano et al., 2003; Velazquez-Fernandez et al., 2005; West et al., 2007). O *IGF-2* exerce os seus efeitos celulares principalmente através da expressão concomitante do receptor de *IGF* tipo 1 (*IGF-1R*). Curiosamente, durante o desenvolvimento dos órgãos no feto humano, a glândula adrenal tem um dos níveis mais elevados de expressão de *IGF-2* que, subsequentemente, diminui após o nascimento (Han et al., 1998). Estas observações sugerem que a ativação da via de *IGF* é um mecanismo patológico comum usado pelas células tumorais durante a tumorigênese adrenocortical.

Utilizando a hibridização genômica comparativa, foi demonstrado que os TCAs infantis são caracterizados por uma alta frequência de alterações cromossômicas, especialmente envolvendo a amplificação no braço longo do cromossomo 9, 9q33-q34 (Figueiredo et al., 1999). Esta região cromossômica abriga o gene do fator esteroidogênico 1 (*SF-1*), e utilizando hibridização fluorescente *in situ*, um aumento no número de cópias de *SF-1* foi detectado em 8 de 9 TCA pediátricos brasileiros. Tal achado sugere uma associação entre a amplificação do gene *SF-1* e a tumorigênese adrenocortical na infância (Figueiredo et al., 2005). Consistente com estes resultados, todos os casos de TCA apresentavam super expressão da proteína *SF-1* (Pianovski et al., 2006). *SF-1* é um membro órfão da família de receptores nucleares de fatores de transcrição e desempenha um papel importante na função

endócrina, incluindo a regulação de hidroxilases de esteróides, desenvolvimento e funcionamento do córtex adrenal, e na diferenciação sexual masculina (Parker et al., 1997). Além disso, o aumento da dosagem de SF-1 promove a proliferação das células e provoca a tumorigênese em camundongos (Doghman et al., 2007).

A alfa-Inibina (*INHA*) parece ser um importante determinante do desenvolvimento do tumor adrenocortical em camundongos (Matzuk et al., 1994). A análise molecular dos TCAs de crianças brasileiras identificou mutações em *INHA*, e LOH foi observada em 8 de 9 tumores, sugerindo que *INHA* funciona como um supressor de TCA em portadores da mutação *TP53* Arg337His (Longui et al., 2004). Portanto, de acordo com um modelo multifatorial de tumorigênese, a penetrância incompleta em portadores da mutação *TP53* Arg337His e desenvolvimento do TCA, poderia ser parcialmente explicado pela aparente necessidade em perder supressores tumorais relevantes (por exemplo, *INHA*) e ativação de oncogenes colaboradores (por exemplo, *SF1* e *IGF-2*).

Está tornando-se claro que a maioria dos cânceres humanos adquiriram defeitos na via de sinalização do supressor tumoral p53, seja por mutação no *TP53* ou por alterações dos reguladores a montante, ou efetores a jusante. Nossos estudos clínicos e moleculares de TCA pediátrico têm permitido o avanço de nossa compreensão sobre a biologia básica da p53 nesses tumores. Foram descobertas importantes relações genótipo-fenótipo entre a consequência bioquímica das mutações germinativas no *TP53* em relação à função da proteína p53 e sua associação com o risco de desenvolver câncer. Estes achados têm implicações importantes para o aconselhamento genético e a conduta clínica. Tendo como foco um raro câncer infantil, como TCA, é possível aprender muito, não somente sobre os mecanismos como a p53 exerce sua função como supressora tumoral, mas também sobre a própria doença e, finalmente, como melhorar os resultados e o prognóstico destes pacientes a longo prazo. O avanço nas pesquisas do TCA pediátrico foi fortemente facilitado pela criação do IPACTR e repositório de amostras de TCA e de sangue de pacientes de várias regiões do mundo (Michalkiewicz et al., 2004; Ribeiro et al., 2012).

Entre a nossa descoberta da mutação germinativa *TP53* R337H relacionada a maior incidência dos TCAs no Sul e Sudeste do Brasil (Ribeiro et al., 2001), e a grande frequência (um portador para cada 370 nascidos vivos) desta mutação no

Estado do Paraná (Custódio et al., 2013), surgiram inúmeros estudos relatando alterações que poderiam explicar o perfil dos tumores benignos e malignos do córtex adrenal, porém todos foram incapazes de avançar nas suas conclusões em relação às alterações genéticas. Ficou bastante claro que a frequência da mutação R337H na população do Estado do Paraná é semelhante a do Estado de São Paulo e sul de Minas Gerais, onde 98% dos TCA apresentaram a mutação R337H (Seidinger et al., 2011).

A tentativa de se encontrar alguma semelhança entre os casos de TCA com mutações na região de domínio de ligação do p53 e a mutação R337H (revisado por Pinto et al., 2011A; Zambetti, 2007), apenas destacou a existência de diferentes padrões de penetrâncias, maior frequência de mutações na linhagem germinativa nos casos de TCA pediátricos, maior proporção de mutações somáticas nos TCA de adultos, e diferenças na perda de função do p53 em relação ao genótipo.

Nos últimos anos surgiram oportunidades em todo o mundo para uma análise mais detalhada do genoma dos tumores humanos por meio das parcerias interinstitucionais e facilitado pelo custo reduzido do sequenciamento genômico completo (WGS) e do sequenciamento completo dos exomas (WES). Foi o que aconteceu na parceria entre o St. Jude Children's Research Hospital e a Universidade de Washington dos Estados Unidos para elucidar as alterações genéticas dos tumores sólidos e das leucemias de crianças. Este grande projeto inicialmente divulgou as alterações epigenéticas com maior foco nos subtipos das leucemias (Huether et al., 2014). Estes autores determinaram a frequência de mutações somáticas de 633 genes diretamente implicados com a regulação epigenética de 1020 tumores pediátricos (21 subtipos de tumores) por meio do WGS e do WES. Nesta rede de pesquisa foi incorporado o projeto dos tumores de córtex adrenal de crianças, com a proposta de elucidar as alterações genéticas relacionadas aos diferentes estágios dos TCAs, em relação ao genoma não tumoral de cada paciente.

O presente estudo permitiu avaliar, com detalhes mais acurados, as alterações que estão presentes nos TCA malignos e benignos, e poderá esclarecer o papel das alterações genéticas associadas às diferentes mutações no gene *TP53*.

3 METODOLOGIA

Aprovação pelo Comitê de Ética e origem das amostras de DNA do sangue e dos tumores de córtex adrenal pediátricos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do St. Jude Children's Research Hospital de Memphis, TN, Estados Unidos e pelo Programa de Avaliação de Tratamento do Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos (ARAR12B1). O local de realização deste projeto foi no St. Jude Children's Research Hospital, rua North Lauderdale, n. 332, Memphis, Tennessee, CEP 38105, EUA.

O consentimento informado foi obtido dos pais ou responsáveis legais para inclusão do paciente no Registro Internacional do Tumor de Córtex Adrenal Pediátrico (IPACTR) do St. Jude Children's Research Hospital (St. Jude) (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00700414>) e do projeto Children's Oncology Group (COG) (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00304070>) que inclui pacientes de São Paulo. O IPACTR registra casos de TCA pediátricos de todo o mundo. Os estudos do COG inscreveu pacientes dos Estados Unidos, Canadá e Sul do Brasil, onde 90% dos casos de TCA acontecem em portadores da mutação *TP53* R337H.

As amostras para o WGS e WES incluíram sangue periférico e tecido tumoral de 26 pacientes do IPACTR, e de 11 pacientes do protocolo COG ARA0332. Um grupo adicional de 34 pacientes com tumores depositados no IPACTR, e amostras de DNA do sangue periférico de 23 casais, pais das crianças com TCA, foram incluídas para análise de LOH do cromossomo 11p, mutação no gene *TP53* e *CTNNB1*. Seis amostras de tecido adrenal normal foram obtidas de pacientes submetidos à nefrectomia devido ao diagnóstico de tumor de Wilms primário do rim, sem envolvimento das adrenais pelo tumor, sendo estas utilizadas como controles normais em estudo de expressão dos genes analisados.

3.1 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA (WGS)

Todas as amostras de tumor foram submetidas a estimativa da pureza ajustada, pureza do tumor, e heterogeneidade do tumor e de análise quantitativa de *chromothripsis* como previamente descrito (Chen et al., 2013). O WGS foi realizado como anteriormente descrito (Cheng et al., 2013; Zhang et al., 2012). O mapeamento do WGS, cobertura, avaliação da qualidade, anotações das variações de um único nucleotídeo (SNV), detecção de indel, a previsão dos efeitos deletérios das mutações pontuais *missense*, e a identificação de LOH foram descritas anteriormente (Cheng et al., 2013). O WGS foi analisado usando o software de CREST como anteriormente descrito (Cheng et al., 2013; Zhang et al., 2012). A referência 37 de montagem do genoma humano do NCBI foi utilizada para mapear as amostras. Alterações no número de cópias (CNAs) foram identificadas comparando as diferenças das leituras obtidas dos tumores em relação às amostras normais pareadas, e usando o algoritmo *CONVERTING* (Copy Number Segmentation by Regression Tree In Next-Gen sequencing).

SNVs foram classificadas em três níveis distintos, como previamente descritos (Chen et al., 2013).

Nível 1: Codificação sinônima, não sinônima e variantes splice-site e variantes não codificadoras

Nível 2: Variantes conservadas (cutoff de conservação ≥ 500 , baseado em duas opções (tabela phastConsElements28way ou tabela phastConsElements17way do UCSC genome browser [<http://genome.ucsc.edu/>] e variantes nas regiões

regulatórias anotadas pelo UCSC annotation [regulatory annotations included targetScanS, ORegAnno, tfbsConsSites, vistaEnhancers, eponine, firstEF, L1 TAF1 Valid, Poly(A), switchDbTss, encodeUViennaRnaz, laminB1, and cpGIslandExt])

Nível 3: Variantes de regiões não repetitivas mascaradas.

Nível 4: Todas as outras SNVs.

3.2 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DOS EXOMAS (WES)

Para o WES, foram preparadas as bibliotecas de DNA a partir de 1,0 µg de DNA do genoma completo amplificado (WGA) de amostras pareadas utilizando-se o kit de preparação de DNA da biblioteca Illumina TruSeq de acordo com o protocolo do fabricante. A qualidade de construção da biblioteca foi avaliada em um Bioanalyzer (Agilent). Amostras da linha germinativa e da biblioteca de diagnóstico foram examinadas de forma independente para captura do exoma usando o kit para exoma da Illumina TruSeq com enriquecimento conforme as instruções do fabricante. As bibliotecas capturadas foram então agrupadas na Illumina c-bot e seqüenciadas em uma plataforma Illumina HiSeq 2000 através da leitura de multiplex de 100 pares de base.

3.3 VALIDAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DE DNA

Para enriquecer regiões que contêm alterações em prováveis sequências, coordenadas genômicas dos alvos da WGS foram utilizadas para encomendar conjuntos de soluções de isca Nimbelgen Seqcap EZ (Roche). Foram realizadas a construção da biblioteca e enriquecimento dos alvos usando-se o repli-G (Qiagen) de DNA do WGA, conforme as instruções do fabricante. Os alvos enriquecidos foram seqüenciados na plataforma Illumina por pareamento final de 100 ciclos. Os dados obtidos foram convertidos em arquivos FASTQ usando-se o programa casava 1.8.2 (Illumina) e mapeados com um alinhador Burrows-Wheeler. Os SNVs putativos e indels do seqüenciamento dos exons foram validados pelo seqüenciamento de amplicon de última geração. Resumidamente, os primers foram projetados para regiões genômicas (hg19) flanqueando o SNV detectado, mas não mais perto do que 100 pares de bases. O PCR foi realizado utilizando-se 20 a 30 ng de DNA a

partir de cada amostra de WGA. As amostras de DNA dos tumores e de amostras pareadas da linhagem germinativa foram utilizadas para cada conjunto de iniciadores para confirmar a presença do SNV / indel na amostra de diagnóstico. O PCR padrão foi realizado em reações de 25 µl, usando-se AccuPrime GC rico em polimerase de DNA (Invitrogen) nas seguintes condições de reação: 95°C durante 3 minutos; 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, e 72°C durante 1 minuto; e uma extensão de 10 minutos a 72°C com esfriamento até 4°C. Todos os amplicons de PCR foram verificados em gem E a 2% (Invitrogen) para garantir a qualidade dos produtos individuais amplificados.

3.4 SEQUENCIAMENTO DO TRANSCRIPTOMA

Para a construção da biblioteca, 2-5 µg de RNA total foram extraídos a partir de amostras de tumores utilizando Mini kits RNeasy da Qiagen, de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de RNA foram medidas usando-se um Espectrofotômetro NanoDrop 100 (Thermo Scientific). A integridade do RNA foi medida usando-se o sistema Bioanalyzer 2100 da Agilent. O RNA total foi tratado com DNAase I (Invitrogen) enriquecida com RNAm poli A, utilizando-se beads de oligo dT (Dynabeads, Invitrogen). A síntese de cDNA usou hexâmeros aleatórios e o kit Superscript para cDNA de dupla hélice (Invitrogen).

3.5 ANÁLISE GISTIC

Foi utilizado o cghMCR (uma implementação R de uma versão modificada de análise GISTIC proposta por Pounds et al., 2013) para localizar regiões que continham alterações numéricas de cópias. Foram identificados genes significativamente amplificados em relação ao controle normal, como aqueles com segmentos de ganhos (SGOL) com três desvios padrão acima da média de escores SGOL de todos os "ganhos". Genes com escores SGOL com 3 desvios padrões, abaixo da média de escores SGOL de todas as "perdas" foram selecionados como genes significativamente suprimidos.

3.6 PERFIL DE CN-LOH

As regiões cn-LOH foram estimadas a partir dos dados da análise da CNA e LOH. Quando CN-LOH foi identificada numa população pura de células tumorais, os alelos heterozigóticos tinham tornado homozigoto para o alelo de referência ou o alelo alternativo. Por conseguinte, as frações de alelos mutantes para SNVs que se acumulam antes de cn-LOH foi 0 (zero) (alelo referência homozigoto) ou 1 (um) (alelo alternativo homozigoto), enquanto que as que ocorrem após SNVs CN- LOH tinha um máximo de 0,5 MAF (assumindo que não há uma segunda mutação no mesmo locus) em células tumorais.

3.7 CONTEÚDO DE DNA TELOMÉRICO E TELÔMERO FISH

Os dados do WGS foram analisados quanto ao teor total de DNA telomérico em tumores combinados com DNA da linha germinativa em 19 casos. As leituras do conteúdo telomérico (TTAGGG)₄ ou (CCCTAA)₄ foram contadas e normalizadas para a cobertura genômica média, e a razão do log₂ das estimativas do conteúdo de diagnóstico e da linhagem germinativa telomérica foram então calculadas para permitir a classificação de conteúdo telomérico como ganho, nenhuma alteração, ou perda (Parker et al., 2012).

3.8 ANÁLISE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NO CROMOSSOMO 11P

Para identificar as regiões comumente excluídas no cromossomo 11p15, avaliamos LOH em 16 pares de amostras de DNA, normais e tumorais, selecionados a partir dos grupos de recorrência (WES) e em 22 casos adicionais. Foram incluídos DNA do sangue periférico de 23 pares de pais. O DNA foi extraído por meio de protocolos padrão. Fluorescência de PCR semi-automatizado de genotipagem foi usada para detectar e analisar as perdas de alelos utilizando-se um painel de cinco marcadores microssatélites (D11S1363, D11S922, D11S4046, HumTH01 e D11S988).

3.9 MUTAÇÕES NO *TP53* E EM OUTROS GENES

Para detectar e validar mutações de *TP53* e outros genes, o DNA genômico de amostras de TCA foi examinado pela técnica de PCR com sequenciamento bi-direcional de DNA do exon 2 ao 11, os limites intron-exon do gene *TP53* e o exon 3 (codons 5-70) do gene *CTNNB1*. As reações de sequenciamento foram realizadas em um Analyzer 3730xl de alto rendimento de DNA (Applied Biosystems).

3.10 INTEGRAÇÃO CROMOSSÔMICA – HHV-6

Foram amplificadas as sequências dos genes da proteína principal do capsídio HHV6 e U94 no tumor e no DNA sanguíneo de casos nos grupos WGS e WES (n = 37). O ensaio de PCR foi realizado de acordo com protocolo previamente descrito (Leite et al., 2005; Arbuckle et al., 2010). Casos positivos para o método de PCR foram testados por análise de FISH. Células mononucleares do sangue periférico foram cultivadas durante 72h em meio RPMI 1640 contendo 20% de FCS. Após 1 hora de tratamento com colcemide, as células foram colhidas de acordo com técnicas citogenéticas convencionais. As células em metáfase foram examinadas por FISH utilizando-se sondas de cosmídeos HHV6 marcadas por nick translation com fluoresceína-dUTP e uma sonda de duas cores mapeada para as sequências 5' e 3' da região de quebra comum dentro do locus MLL (11q23) (Abbott Molecular). A mistura de sondas HHV6/MLL foi aplicada para marcar células em metáfase e incubadas a 37°C por 12 horas. Posteriormente a lâmina foi lavada com SSC 2X, e 10 µl de contra-corante DAPI foi aplicado à área marcada para visualização.

4 RESULTADOS

As características clínicas e biológicas dos 37 (trinta e sete) casos de TCA estudados por WGS e WES estão resumidas nas Tabelas suplementares 1a e 1b. A idade mediana ao diagnóstico de 25 (vinte e cinco) meninas e 12 (doze) meninos foi de 53,5 meses (variação de 9,7-184,7 meses). Os tumores eram esporádicos (n = 10) ou associados com síndromes constitucionais (LFS, n=25; BWS, n=2) e incluíam 29 (vinte e nove) carcinomas, 3 (três) adenomas e 5 tumores de histologia indeterminada. Embora o tratamento não tenha sido uniforme, quase todos seguiram o protocolo ARAR0332 do Children's Oncology Group (Ribeiro et al., 2012), que

consiste em cirurgia isolada para doença em estágio I e II, e cirurgia seguida de quimioterapia intensiva (cisplatina, doxorrubicina, etoposídeo e mitotano) para estágio avançado da doença (III e IV). Em um período de acompanhamento médio de 38 meses, 11 dos 35 (31%) pacientes tinham apresentado um evento adverso (recaída ou óbito). Cinco destes 11 morreram de doença progressiva e seis permanecem vivos em segunda remissão completa. Dois pacientes foram perdidos do acompanhamento. Os dados clínicos dos 34 pacientes adicionais com TCA, estudados como um grupo de validação, foram incluídos na Tabela Suplementar 1c.

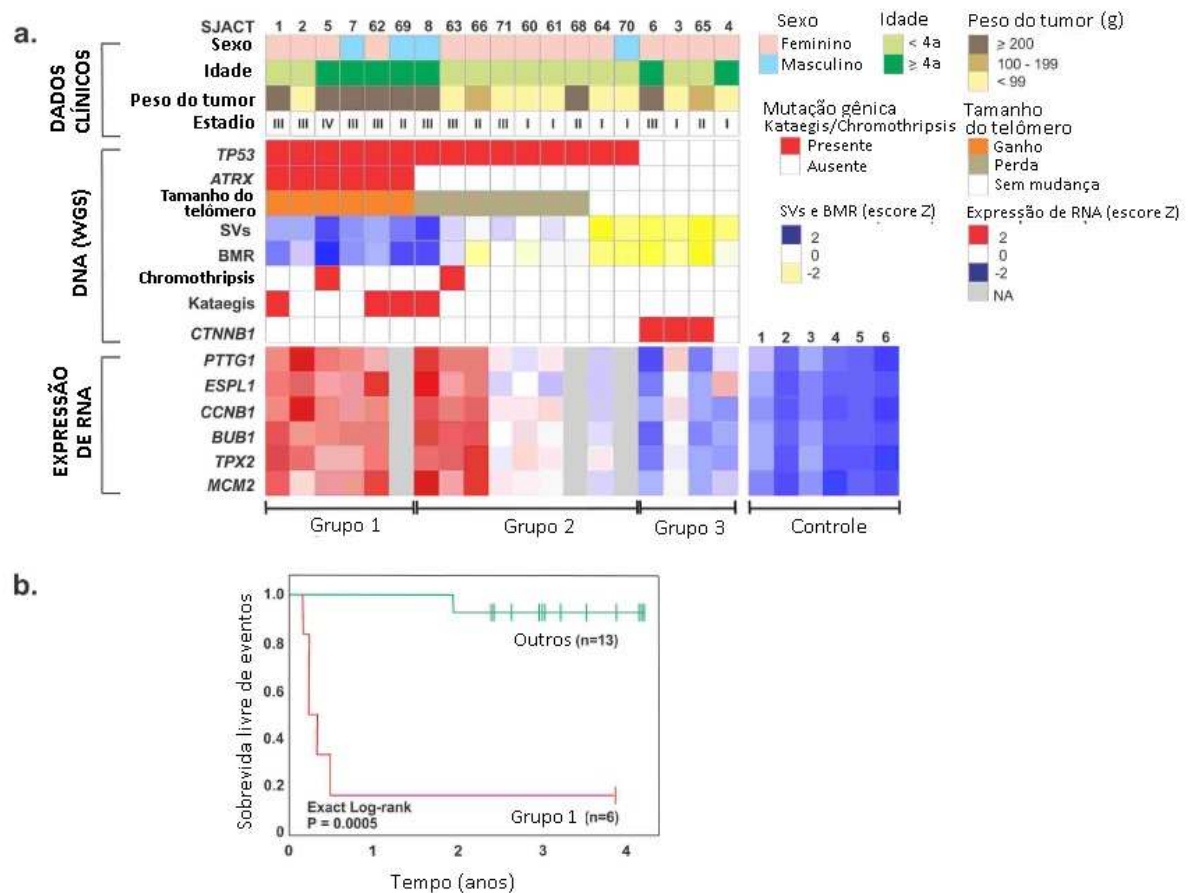


Figura 1. Associação entre as características moleculares e clínico-patológicas de tumores adrenocorticais pediátricos. (a) Painel superior: características clínico-patológicas de 19 pacientes do grupo WGS. Painel central: alterações genéticas, incluindo o status mutacional do TP53, ATRX e CTNNB1; comprimento dos telômeros; número de variações estruturais (SVs); taxa de mutação basal (BMR); chromothripsis e kataegis. Painel inferior: expressão de RNA de genes selecionados envolvidos na segregação cromossômica e controle do ciclo celular. Três grupos distintos de tumores (marcados abaixo) surgiram a partir dessa análise. Controle: tecido adrenocortical normal. (b) probabilidade de sobrevivência livre de eventos segundo o método de Kaplan-Meier (teste exato log-rank) dos pacientes com TCA pediátricos no grupo 1 vs os demais pacientes.

4.1 ANÁLISES DO GENOMA E TRANSCRIPTOMA

DNA de tumores adrenocorticais e o correspondente DNA do sangue periférico foram analisados por WGS (n=19) a uma média de cobertura 41,9X (Tabela Suplementar 2a) ou pelo WES (n=18) a uma média de cobertura 84,8X (Tabela Suplementar 2b). Todas as lesões genéticas, incluindo as variações de nucleotídeo único (SNV), pequenas inserções/deleções (indels) e variações estruturais (SVs) foram validadas experimentalmente. Nas amostras do WGS, o número mediano de mutações pontuais não silenciosas foi de 5 (faixa de 1-97), a taxa de mutação de base/de fundo (TMB) mediana foi de $3,78 \times 10^{-7}$ (variação de $5,01 \times 10^{-8}$ a $2,40 \times 10^{-6}$) e o número mediano de SVs foi de 61 por caso (variação de 0-812) (Tabela Suplementar 3a-d). Perfis de transcriptomas dos tecidos adrenocorticais normais (n=6) e amostras de TCA do grupo WGS (n = 16) foram analisados por sequenciamento de RNA (RNA-seq) (Tabela Suplementar 2c).

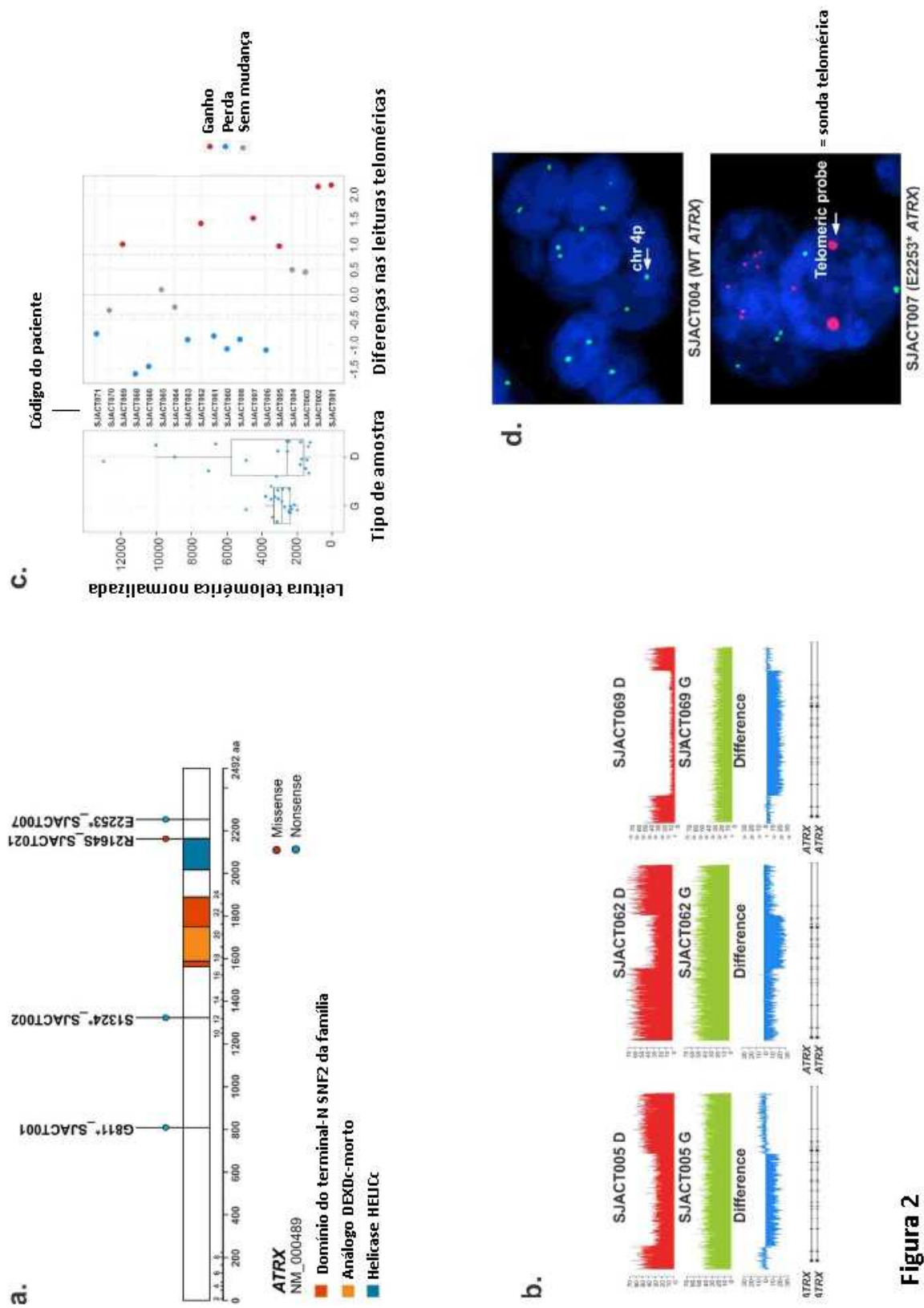


Figura 2

Figura 2. Mutações somáticas no ATRX e análise dos telômeros dos tumores adrenocorticais pediátricos. (a) Distribuição de variações de nucleotídeo único não-silenciosas em ATRX (pontos azuis: mutação nonsense; pontos vermelhos: mutação missense). (b) Wiggle plots mostrando deleção interna de vários éxons no gene ATRX em SJACT005, SJACT062 e SJACT069 (diagnóstico de tumor [D] e amostras germinativas [G]). (c) o comprimento relativo dos telômeros determinado por WGS em TCA pediátricos versus amostras germinativas correspondentes. (d) Imagens de amostras tumorais hibridizadas com o FISH telomérico (vermelho), sondas do cromossomo 4p (verde) e corados com DAPI para visualizar o núcleo (azul). Visualizações de alta ampliação demonstram o sinal amplo e ultra brilhante do ATRX mutante em células de tumor adrenocortical (SJACT007).

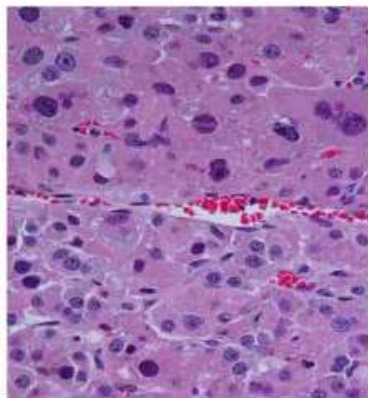
4.2 MUTAÇÕES NO TP53

Mutações germinativas no gene TP53 foram identificadas em 25 dos 37 pacientes (68%), incluindo 12 mutações R337H fundadoras, nos grupos WGS e WES combinados (Figura 1a e Figura Suplementar Figura 3a). Mutações somáticas (R175H, R273C e deleção homozigótica de ~200 Kb do cromossomo 17 englobando o TP53) também foram identificadas em 3 dos 12 TCAs associados com a linhagem germinativa selvagem do TP53 (Figura 3a e Figuras Suplementares 3a, b).

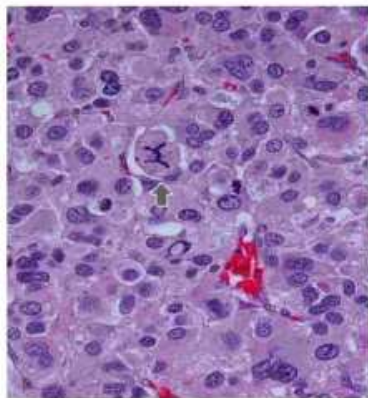
Peso do TCA

Peso do TCA

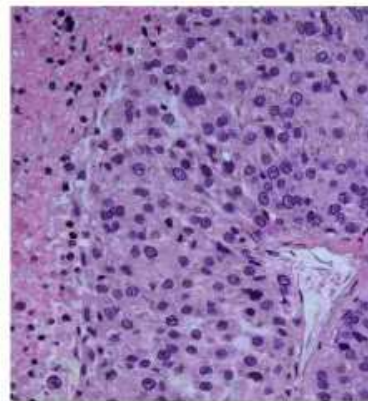
48g



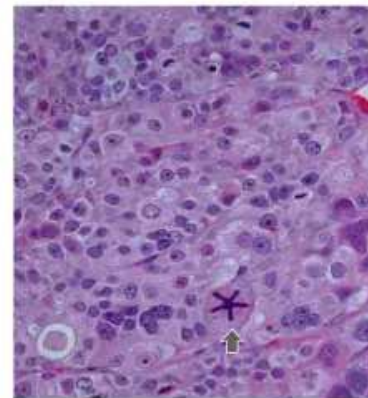
689



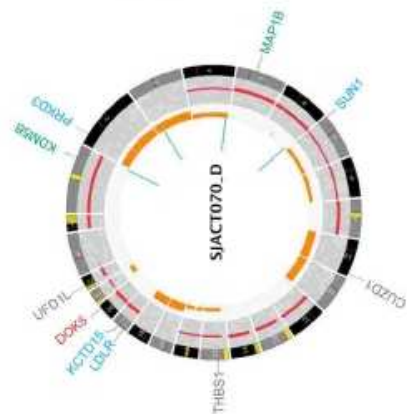
260g



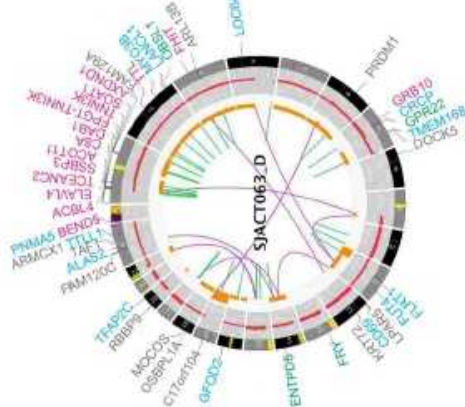
670g



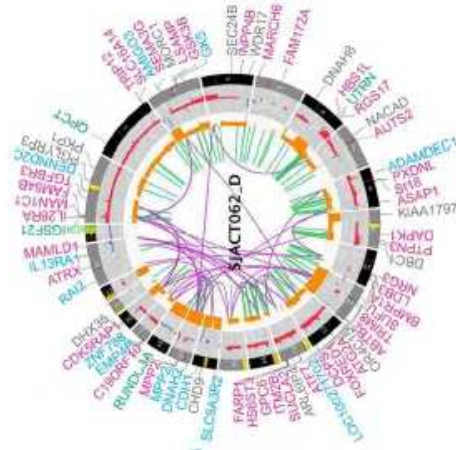
Grupo 2



Grupo 2



Grupo 1



Grupo 1

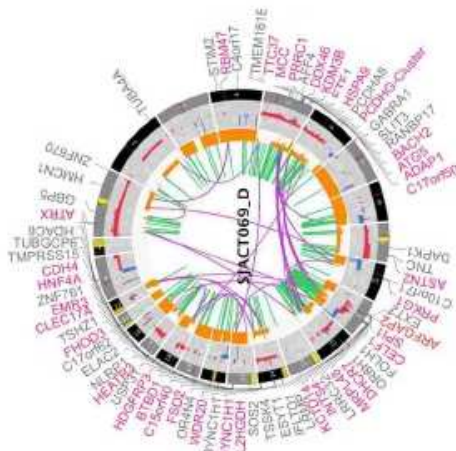


Figura 3. Características histopatológicas e genômicas de TCA com TP53 R337H. Todos os tumores tiveram um elevado índice mitótico (> 5 por 50 campos de alta aumento, H&E, 400X). A histologia demonstrou um padrão vago de grupos e cordões celulares ao lado de áreas de tamanho variado sem padrão distinto. Três casos (SJACT063, SJACT062 e SJACT069) demonstraram um alto grau nuclear e acentuado pleomorfismo celular. SJACT070 teve ocasionais núcleos hipercromáticos e com um ou mais proeminentes nucléolos (SJACT69). O acúmulo de alterações genômicas ilustrado pelos circos plot (painéis inferiores) em paralelo com um aumento no peso do tumor, está correlacionado com um fenótipo tumoral mais agressivo (Grupo 1 vs Grupo 2). Nota: As marcações para gene interrompidos SVs (SJACT063 e SJACT062) e mutações não-codificantes (SJACT069) foram retirados dos circos plots.

O método de sequenciamento de Sanger identificou mutações germinativas no TP53 em 11 dos 34 casos (32%) no grupo de validação. Daqueles com TP53 germinativa do tipo selvagem (n=23) nesse grupo, três tumores adquiriram uma mutação somática (c.134_135 insT, E180K e R273H) (Figura Suplementar 4a).

Figura 4. Caracterização de LOH nos cromossomos 11 e 17 em TCA pediátrico. (a) Análise de microssatélites do cromossomo 11p15 no grupo WES. Todos os casos com DNA parental disponível demonstraram perda seletiva de cromossomo materno 11p15 (n=8, roxo). (b) LOH nos cromossomos 11p e 17p e acúmulo de variações de nucleotídeo único (SNVs) em SJACT002. Gráficos de dispersão que mostram frações de alelos mutantes (MAFs) de SNVs somáticas e suas posições genômicas (pontos individuais) combinado com gráficos de densidade 2-D de valores de desequilíbrio alélico (AI) de SNPs heterozigotos da linhagem germinativa em regiões dos cromossomos 11p (esquerda) e 17p (centro). À direita, os valores de AI em regiões de cn-LOH dos cromossomos 11p e 17p foram comparados com a distribuição MAF das SNVs somáticas em regiões genômicas cn-LOH. (c) Células necróticas e figuras de mitose atípica (seta) são identificadas em SJACT63 e o gráfico de dispersão resume a ordem temporal de cn-LOH dos cromossomos 11p e 17p e acúmulo de SNV somática em TCAs pediátricos. São também mostradas as medianas de AI para a região cn-LOH do cromossomo 11p, as medianas de AI para a região cn-LOH do cromossomo 17p, e mediana MAF de SNVs em regiões genômicas cn-LOH de 14 casos. Em adição, a Figura 4 mostra as indicações para SJACT002, SJACT005. A Figura Suplementar 7b exhibe, igualmente, resultados pertinentes.

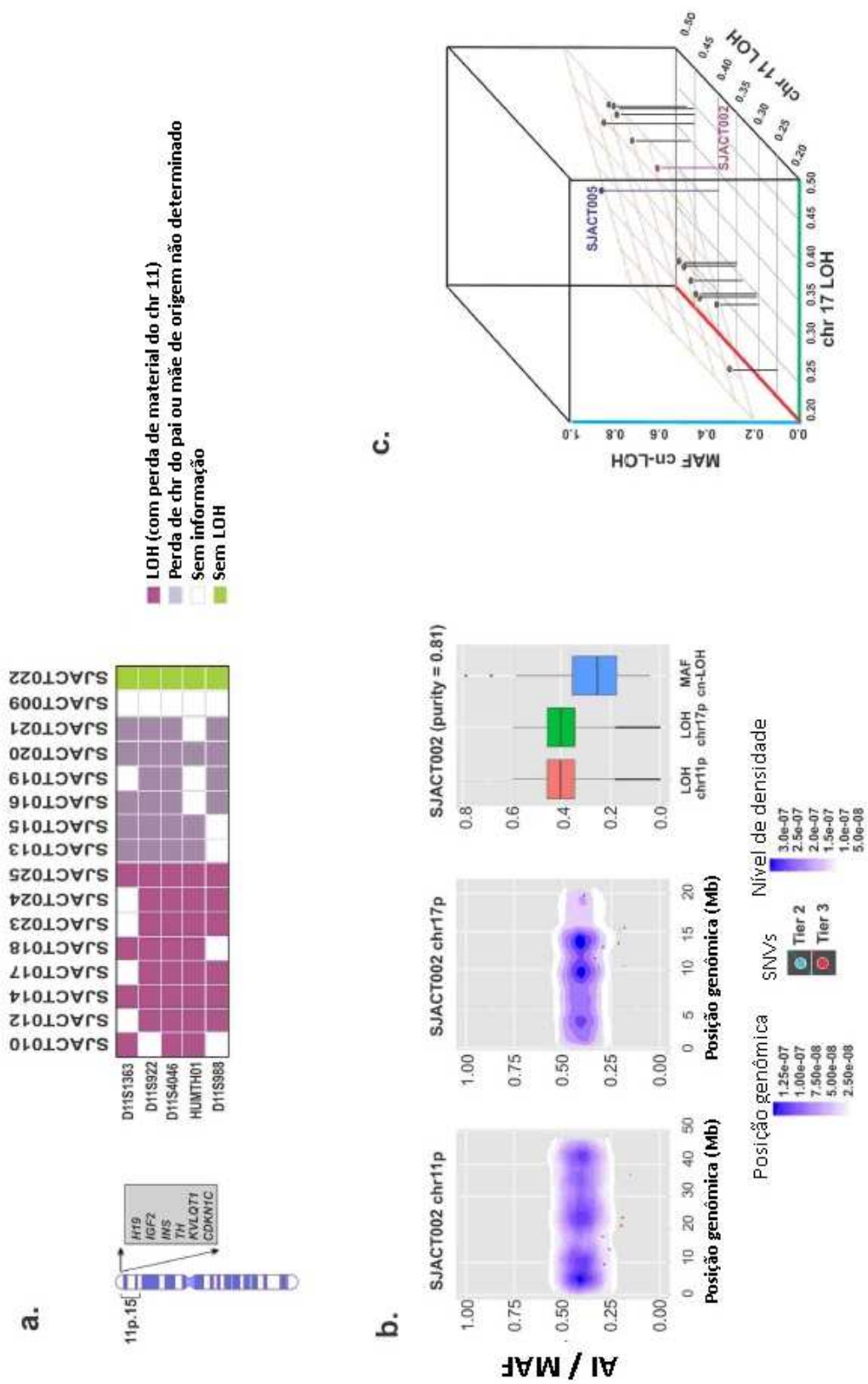


Figura 4

4.3 MUTAÇÕES SOMÁTICAS ATRX

ATRX codifica uma helicase que funciona na remodelação da cromatina e manutenção estrutural do telômero, e coopera com o DAXX para incorporar a histona variante H3.3 na cromatina (Clynes et al., 2013). Mutações somáticas nonsense no ATRX e SVs excluindo vários éxons foram identificadas por WGS em 6 de 19 TCAs (32%), todas as quais foram associadas à mutações germinativas no TP53 (Figuras 1a e 2a,b). Uma mutação somática missense no ATRX (R2164S) também foi identificada por WES em um caso contendo uma deleção somática homozigota do TP53 (Figura 2a e Figura Suplementar 3b). Nenhuma mutação no DAXX ou TERT foi detectada em nosso grupo. Embora uma extensa amplificação da região abrangendo o locus TERT tenha sido observada em 13 dos 19 casos WGS (68%), não foi detectada expressão do TERT pelo RNA-seq (dados não mostrados). Análise do comprimento dos telômeros baseado em WGS mostrou um aumento de DNA telomérico em todos os seis tumores com mutações no ATRX, mas não em tumores com o tipo selvagem ATRX ($P=3,7 \times 10^{-5}$, teste exato de Fisher) (Fig. 2c). Análise de telômero por FISH de 22 amostras disponíveis de tumores fixados em formalina, emblocados em parafina, revelou focos amplo e ultra-brilhante no telômero (Fig. 2d e dados não apresentados), em casos que albergam mutações no ATRX (n=5), sugerindo a ativação de um mecanismo de alongamento alternativo dos telômeros (ALT). Focos teloméricos foram também observados em SJACT023, embora WES tenha sido incapaz de detectar uma mutação ATRX neste tumor (dados não apresentados).

4.4 MUTAÇÕES SOMÁTICAS NA B-CATENINA

Mutações somáticas na β -catenina (CTNNB1) foram identificadas em 3 dos 37 tumores analisados nos grupos WGS e WES combinados (8%) (Figura 1a e Figura Suplementar 5). O sequenciamento alvo de Sanger revelou 10 mutações somáticas adicionais no CTNNB1 em 34 TCAs pediátricos de um grupo de validação (Figura Suplementar 4b). Em geral, as mutações no CTNNB1 (n=13) foram detectadas

apenas entre os casos de TP53 selvagem na linhagem germinativa (n=35) e não em tumores de pacientes com mutações constitucionais no TP53 (n=36) ($P=2,5 \times 10^{-5}$, teste exato de Fisher). No entanto, três tumores com mutações somáticas no CTNNB1 também adquiriram uma mutação no TP53 (IPACTR001, IPACTR013 e IPACTR019) (Figura Suplementar 4b).

4.5 CLASSIFICAÇÃO GENÔMICA DO TCA

Os resultados do WGS definiram três grupos de TCA pediátrico com base no perfil mutacional dos genes TP53 e ATRX: Grupo 1) Mutação germinativa no TP53 e somática no ATRX (n=6); Grupo 2) Mutação germinativa no TP53 e nenhuma mutação no ATRX (n=9); e Grupo 3), TP53 e ATRX, ambos selvagens (n=4) (Figura 1a). Grupo 1, os casos apresentaram tumores com pesos significativamente maiores ($P=0,0066$, teste de Mann-Whitney), e os pacientes foram significativamente mais propensos a pertencerem ao estágio 3 ou 4 da doença ($P=0,0198$, teste de Kendall), e foram associados com pior sobrevida livre de eventos em comparação com os Grupos 2 e 3 ($P=5,0 \times 10^{-5}$) (Figura 1a,b). Os TCAs do Grupo 1 também tiveram um número significativamente maior de SVs ($P=0,021$, teste de Mann-Whitney) e maior taxa de mutação de base (BMR) ($P=0,015$, teste de Mann-Whitney) (Figura 3c Suplementar). Além disso, estes tumores apresentaram significativamente maior expressão de genes associados à instabilidade cromossômica e desregulação do controle do ciclo celular (PTTG1, $P=0,019$; ESPL1, $P=0,015$; CCNB1, $P=0,018$; BUB1, $P=0,023$; TPX2, $P=0,032$; MCM2 $P=0,040$, teste t) (Figura 1a). As características clínicas e moleculares dos casos do Grupo 2 foram mais heterogêneas, com números variáveis de SVs e BMR, e expressão de genes alvo (Figura 1 e Figura Suplementar 3c). O grupo 3 mostra os tumores que apresentaram um número relativamente pequeno de SVs e uma baixa BMR, e a expressão de genes alvo foi semelhante à do tecido adrenocortical normal, e consistente com um prognóstico mais favorável (Figura 1 e Figura Suplementar 3c). O WGS não revelou qualquer alteração genética específica capaz de distinguir TCAs com TP53-R337H de tumores com outras mutações no TP53. No entanto, os tumores com TP53 R337H que adquiriram uma mutação no ATRX (SJACT062 e SJACT069) agruparam no Grupo 1 e exibiram um fenótipo agressivo (Figuras 1 e 3).

Os 8 casos com TP53 R337H restantes apresentaram perfis moleculares e estadios da doença variáveis (Figura 1 e Figura Suplementar 2). A relação entre as características histopatológicas, peso do tumor e complexidade das anormalidades genômicas em quatro casos com a mesma mutação germinativa TP53 R337H é ilustrada na Figura 3.

4.6 PERDA DE HETEROZIGOSE DOS CROMOSSOMOS 11 AND 17

A LOH no cromossomo 17 foi observada em 28 de 37 TCAs (76%) por análise WGS e WES. Todos os tumores com mutações germinativas (n=25) e somáticas (n=3) sofreram LOH com seleção do alelo selvagem (Fig. Suplementar 2 e dados não mostrados). Mais especificamente, WGS demonstrou cópia neutra de LOH (cn-LOH) do cromossomo 17 inteiro em todos os tumores associados a mutações germinativas no TP53 (n=15), bem como dois (SJACT003, SJATC004) dos quatro casos TP53 selvagem (Fig. Suplementar 2). LOH no cromossomo 11p também foi identificada em 32 dos 35 casos de TCA (91%). Dois pacientes com BWS (SJACT009 and SJACT065) com homoziguidade 11p germinativa, sugestiva de dissomia uniparental (UPD), foram excluídos da análise pois a LOH não pode ser avaliada (Figura Suplementar 2 e Figura 4a). Além disso, cn-LOH do cromossomo 11p foi demonstrado por WGS em 14 de 18 TCAs analisados (Fig. Suplementar 2). Análise do marcador microssatélite de 22 casos adicionais de TCA pediátrico do grupo de validação, revelou LOH do cromossomo 11p em 20 tumores (95%; um caso [IPACTR004] foi excluído devido à UPD) (Figura Suplementar 4c). Notavelmente, 100% dos casos dos grupos combinados que sofreram LOH no cromossomo 11p15 e possuíam DNA parental disponível (n=23), mantiveram seletivamente o cromossomo paterno ($P=2,4 \times 10^{-7}$) (Figura 4a e Figura Suplementar 4c).

A região 15 do braço curto do cromossomo humano 11 (ch11p15) contém um grande conjunto de genes imprintados, incluindo IGF-2, CDKN1C, KCNQ1 e H19. IGF-2 é um fator de crescimento fetal expresso pelo alelo paterno, enquanto que o inibidor do ciclo celular CDKN1C (p57), a proteína do canal de potássio KCNQ1 e os transcritos não codificantes H19, são expressos pelo alelo materno. A expressão de genes localizados na região 11p15 (chr11: 1704500-3658789) foi analisada por perfil de transcriptoma. O sequenciamento do RNA confirmou maior expressão de IGF2

em todos os tumores do grupo WGS em comparação com o tecido adrenocortical normal ($P=2,987 \times 10^{-07}$, teste t) (Fig. Suplementar 6). A expressão de KCNQ1, CDKN1C e H19 foi baixa na maioria dos casos, consistente com a perda do cromossomo 11p materno. SJACT006, que manteve ambas as cópias do cromossomo 11, também exibiu elevada expressão de IGF-2 e desregulação dos genes expressos pelo alelo materno, sugerindo perda do controle de imprinting neste local (Figura Suplementar 6).

4.7 CRONOLOGIA DA CN-LOH DOS CROMOSSOMOS 11 E 17

Para avaliar a ordem temporal de aquisição de SNV somática e cn-LOH dos cromossomos 11 e 17, comparamos as frações de alelos mutantes (MAFs) de SNVs em regiões cn-LOH com valores de desequilíbrio alélico (AI), os quais expressam as diferentes frações dos alelos mutantes (SNPs heterozigoto germinativo) no tumor versus amostras germinativas (Figuras 4b,c e Figura Suplementar 7). Um evento cn-LOH nas células tumorais irá levar a um valor esperado de AI de 0,5. Da mesma forma, SNVs somáticas adquiridas antes da cn-LOH resultaria em qualquer alelo de referência homozigótica (R) ou alelo mutante homozigoto (M), enquanto SNVs acumuladas após cn-LOH permaneceria heterozigotas na ausência de um segundo evento (Figura Suplementar 7a). A análise do WGS de 14 amostras informativas demonstrou que a maioria das SNVs nos cromossomos 11p e 17p foram adquiridas após cn-LOH, embora SJACT005 tenha sofrido cn-LOH durante o acúmulo de SNV (Figuras 4b,c e Figura Suplementar 7b). Estes resultados indicam que cn-LOH do cromossomos 11p e 17p ocorre no início da tumorigênese adrenocortical e precede o acúmulo de SNVs nessas regiões.

4.8 INTEGRAÇÃO CROMOSSOMAL DO HERPESVÍRUS HUMANO 6

O herpesvírus humano 6 (HHV-6) foi detectado por WGS na linhagem germinativa e no DNA tumoral do SJACT004 (Figura 5a) e pelo sequenciamento de Sanger em SJACT017 (dados não apresentados). A análise de FISH confirmou o local de integração cromossômica do HHV-6, assim como a região telomérica do 11p em

ambos os casos (Figura 5b). A análise da PCR demonstrou a transmissão paterna do HHV6 cromossomicamente integrado no paciente SJACT017 (Figura 5c).

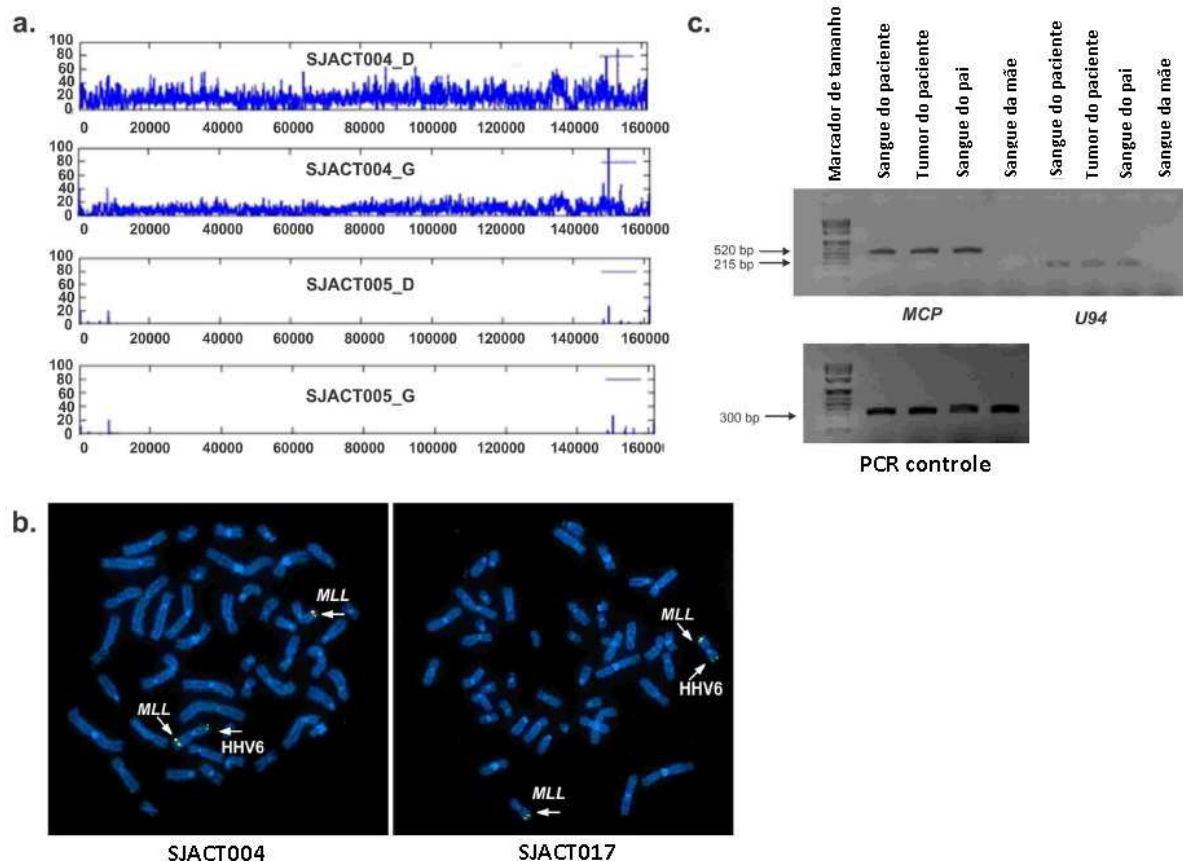


Figura 5. Integração cromossômica do herpesvírus humano 6 em TCA pediátrico. (a) Cobertura da plotagem para os casos SJACT004 e SJACT005 mostrando diagnóstico do tumor (D) e amostras germinativas (G) revela a integração do genoma completo do HHV6 em SJACT004. O genoma do HHV6 está duplicado na amostra de tumor como consequência da cn-LOH. (b) Hibridação fluorescente in situ (FISH) de cromossomos metafásicos utilizando-se sangue periférico confirmou a integração do HHV6 em 11p, em ambos os casos. A sonda MLL (cromossomo 11q23) foi utilizada como controle (esquerda, SJACT004; direita, SJACT017). (c) HHV6 MCP (principal proteína do capsídio) e U94 foram amplificados por PCR de SJACT017 (linhagem germinativa e tumores) e DNA parental demonstrando a transmissão vertical paterna do HHV6 integrado. Exon 6 do gene TP53 foi amplificada como controle de qualidade do DNA.

A análise dos marcadores microssatélites e WGS confirmaram LOH no cromossomo 11 com a seleção para HHV6 integrado em cada caso (Figura Suplementar 2, Figura 4a e Figura Suplementar 4c). Análises genômica e do transcriptoma de SJACT004 identificaram poucas SNVs e SVs somáticas, mas elevada expressão de IGF-2 (Figuras Suplementares 2 e 6). Ambos os TCAs eram pequenos, estágio 1 e com bom prognóstico (Tabela Suplementar 1a,b).

4.9 OUTROS EVENTOS GENÉTICOS

Variações no número de cópias cromossômicas também foram avaliadas por uma versão modificada do GISTIC (identificação genômica de alvos significativos em câncer). Deleção focal do cromossomo 4q34 foi observada em 11 dos 19 casos avaliados por WGS (58%) (Figura Suplementar 8a,b). Ganhos no número de cópias foram generalizados com destaque do cromossomo 9q sendo superrepresentados e amplificado em 16 dos 19 TCAs avaliados (Figura Suplementar 8a,c). Fragmentação dos cromossomos consistentes com chromothripsis (Forment et al., 2012) (Figura Suplementar 9) e padrões de hipermutação localizada referidos como kataegis (Nik-Zainal et al., 2012) (Figura Suplementar 10) foram observados em tumores em estágio avançado (Figura 1a). Variantes estruturais que resultam na expressão de genes fusionados não foram frequentes e nem recorrentes (Tabela Suplementar 4).

5 DISCUSSÕES

Nossas análises genômicas definem cn-LOH do cromossomo 11p, com seleção contra o cromossomo materno e consequente super expressão de IGF-2, como um evento precoce e um marco da tumorigênese adrenocortical pediátrica. Embora o TCA pediátrico seja fortemente associado a mutações germinativas no TP53 (Oren, 2003; Nichols et al., 2001; Ruijs et al., 2010), incluindo 60-70% das crianças com TCA (Wasserman et al, 2012.), apenas 4 a 6% dos portadores desta mutação desenvolvem TCAs (Ribeiro et al., 2012), o que sugere o envolvimento de alterações genéticas colaborativas. Propomos que as mutações germinativas no TP53 podem contribuir para a tumorigênese adrenocortical promovendo a instabilidade cromossômica (Bischoff et al., 1990; Liu et al., 1996). Neste cenário, células aneuplóides do córtex adrenal que sofrem LOH no cromossomo 11p e desregulação dos genes na região de imprinting 11p15, podem ser selecionadas e expandidas através de super expressão constitutiva do IGF-2, o qual codifica um potente mitógeno e uma proteína promotora do crescimento fetal (Ehrlich, 2002; Feinberg e Tycko, 2004). Este mecanismo é consistente com nossa observação de anormalidades no cromossomo 11p e super expressão de IGF-2 em todos os casos de TCA com mutações germinativas no TP53. Clones que sofrem LOH no cromossomo 17 e perdem o alelo selvagem TP53, tornam-se mais instáveis, acumulam SNVs adicionais e são selecionados para outra expansão. Em suporte a esta hipótese, nossos estudos temporais colocam cn-LOH dos cromossomos 11p e 17 durante o início da tumorigênese, antes da aquisição de alterações genômicas generalizadas.

Três alterações [2 polimorfismos no gene TP53 (R72P e Ins16) e o SNP309 no gene MDM2], foram reportadas em câncer de mama de mulheres portadoras da mutação TP53 R337H, por pesquisadores do Centro Infantil Boldrini e do St. Jude Children's Research Hospital (Assumpção et al., 2008). Entretanto, estas alterações não são frequentes nos TCAs. Por outro lado, a ampliação do número de cópias do gene do fator esteroideogênico 1 (SF-1) nos TCAs de crianças (Figueiredo et al., 2005; Letourzé et al., 2012), que se correlaciona com o aparecimento de TCA em

camundongos transgênicos de SF-1 (Doghman et al., 2007), não foi confirmada no presente estudo, o que pode estar relacionada com as diferenças metodológicas.

LOH do cromossomo 11p15 e anomalias de imprinting genômico nesta região, que levam à expressão constitutiva de IGF-2, são características de muitos outros tumores pediátricos, incluindo rabdomiossarcoma alveolar (Smith et al., 2001), tumor de Wilms (Rainier et al., 1993), e hepatoblastoma (Mussa et al., 2011). Da mesma forma, os carcinomas adrenocorticais adultos, mas não os adenomas, apresentam anormalidades de imprinting genômico no cromossomo 11p15 (Gicquel et al, 1997;. Assie et al, 2014.). No entanto, modelos de camundongos transgênicos demonstram que a super expressão do IGF-2 não é suficiente (Sun et al., 1997), e deve colaborar com outras alterações genéticas, como a ativação da beta-catenina (Heaton et al., 2012), para promover a tumorigênese adrenocortical. De acordo com estes resultados, as mutações ativadoras no gene CTNNB1 foram relativamente frequentes em nosso grupo, principalmente nos casos com TP53 germinativo do tipo selvagem.

A falta de fortes indicadores de prognóstico tem limitado o progresso no tratamento do TCA infantil. A sobrevida global livre de eventos adversos é apenas cerca de 50%, e os pacientes com doença em estágio avançado têm sobrevida global ruim (Ribeiro et al, 2012; Michalkiewicz et al., 2004). Ao contrário de estudos de outros tumores embrionários pediátricos (Ehrlich et al., 2013;. Parham, 2001; Valentijn et al., 2012), o exame histopatológico (Dehner e Hill, 2009) e os achados moleculares (El Wakil et al., 2011) em TCA pediátrico não têm produzido categorias de prognósticos relevantes ou possibilitado novas abordagens terapêuticas. Peso do tumor, volume e ressecabilidade cirúrgica formam a base da atual classificação de estágio da doença do Grupo de Oncologia Infantil - Children's Oncology Group (COG) (Ribeiro et al., 2012). Todavia, este sistema necessita de aperfeiçoamento, visto que muitos pacientes sofrem recaída apesar de terem pequenos tumores que foram completamente ressecados; enquanto outros pacientes são curados apesar dos resultados histológicos serem sugestivos de carcinoma (Magro et al., 2012). Nossa análise genômica abre oportunidades para esclarecer melhor a malignidade do TCA, que considera como pilares básicos, o tamanho do tumor, a histologia, e o

estadio da doença como os elementos mais importantes para determinação do prognóstico do TCA pediátrico (Ribeiro et al, 2012; Michalkiewicz et al, 2004.). Notavelmente, tumores com ambas as mutações, mutação germinativa no gene TP53 e somática no gene ATRX (Grupo 1), foram significativamente associados com um elevado peso do tumor, com doença avançada (estadio COG III/IV), e baixa sobrevida livre de eventos. SJACT069 exemplifica um caso que foi classificado como doença limitada (COG estadio II) e inicialmente tratada somente com cirurgia, mas posteriormente metastatizou para os pulmões. Além disso, 5 de 6 pacientes do Grupo 1 apresentaram eventos adversos (recaída ou óbito), consistente com as descobertas genômicas indicativas de um fenótipo agressivo. Sete casos com mutações germinativas no gene TP53, porém com o gene ATRX do tipo selvagem (Grupo 2), apresentaram relativamente poucas alterações genômicas e excelente evolução clínica. Todos os pacientes eram portadores da mutação TP53 R337H, e 71% tinham tumores pequenos (<100 g) ao diagnóstico. Como esses pacientes foram diagnosticados no Sul do Brasil, onde os pediatras estão cientes da susceptibilidade ao TCA, eles tendiam a receber diagnóstico e tratamento precoces. A triagem neonatal para o TP53 R337H e vigilância dos portadores para o diagnóstico precoce do TCA (Custódio et al., 2013) sugerem que pacientes com TP53 R337H, e possivelmente qualquer mutação germinativa no TP53, teriam adquirido adicionais alterações moleculares adversas se não tivessem sido submetidos à ressecção precoce do tumor.

Em dois casos (SJACT004 e SJACT017), o HHV6 foi seletivamente integrado à região telomérica do cromossomo 11p. O HHV-6 é conhecido por integrar-se ao genoma a uma baixa frequência (~1%), preferindo as regiões teloméricas dos cromossomos 9q, 11p, 17p e 19q (Nacheva et al., 2010; Morissette e Flamand, 2010). A integração do HHV-6 poderia facilitar a cn-LOH em 11p e a desregulação do imprinting no locus 11p15, levando a uma super expressão do IGF-2. Em resumo, nosso estudo identificou alterações genéticas fundamentais envolvidas na tumorigênese adrenocortical pediátrica. A complexidade genômica dos TCAs infantis, particularmente aqueles com ambas as mutações, germinativa no TP53 e adquirida no ATRX, pode explicar a falha da quimioterapia padrão, ressaltando a importância do diagnóstico precoce e aperfeiçoamento da classificação prognóstica.

6 CONCLUSÕES

O carcinoma adrenocortical pediátrico é uma neoplasia rara com mau prognóstico. Encontramos que a perda de heterozigose do cromossomo 11p ocorreu em 91% dos TCA e em todos os casos considerados informativos e selecionados contra o cromossomo materno, o que resultou na elevada expressão de IGF-2 em 100% dos tumores. Encontramos também que mutações no TP53 e LOH do cromossomo 17, com seleção contra o TP53 tipo selvagem foram observadas em 28 casos de TCA (76%), e que LOH de cópia neutra dos cromossomos 11p e 17 ocorreu durante o início da tumorigênese, sugestivo de que estes eventos são condutores do desenvolvimento tumoral. As alterações genéticas adicionais encontradas, mutações somáticas recorrentes no ATRX e CTNNB1, bem como a integração do HHV-6 na região telomérica do cromossomo 11p, podem contribuir para o crescimento do TCA. Um prognóstico muito adverso foi previsto por mutações concomitantes em TP53 e ATRX e anormalidades genômicas associadas, incluindo variações estruturais complexas e uma elevada taxa de mutação de base. Coletivamente, esses achados demonstram a natureza, a cronologia e o potencial significado prognóstico das alterações genéticas no TCA pediátrico e delineam uma proposta de modelo de tumorigênese adrenocortical pediátrica.

REFERÊNCIAS

ALTEKRUSE, S. F.; KOSARY, C. L.; KRAPCHO, M.; NEYMAN, N.; AMINOU, R., WALDRON, W.; RUHL, J.; HOWLADER, N.; TATALOVICH, Z.; CHO, H.; MARIOTTO, A.; EISNER, M. P.; LEWIS, D. R.; CRONIN, K.; CHEN, H. S.; FEUER, E. J.; STINCHCOMB, D. G.; EDWARDS, B. K.; (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and Results Program. Bethesda, MD, nov 2009. Disponível em: <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/>. Acesso em 23 out 2014.

ARBUCKLE, J. H.; MEDVECZKY, M. M.; LUKA, J.; HADLEY, S. H.; LUEGMAYR, A.; ABLASHI, D.; LUND, T. C.; TOLAR, J.; DE MEIRLEIR, K.; MONTOYA, J. G.; KOMAROFF, A. L.; AMBROS, P. F.; MEDVECZKY, P. G. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 107, n. 12, p. 5563-5568, mar 2010.

ASSIE, G.; LETOUZÉ, E.; FASSNACHT, M.; JOUINOT, A.; LUSCAP, W.; BARREAU, O.; OMEIRI, H.; RODRIGUEZ, S.; PERLEMOINE, K.; RENÉ-CORAIL, F.; ELAROUCI, N.; SBIERA, S.; KROISS, M.; ALLOLIO, B.; WALDMANN, J.; QUINKLER, M.; MANNELLI, M.; MANTERO, F.; PAPATHOMAS, T.; DE KRIJGER, R.; TABARIN, A.; KERLAN, V.; BAUDIN, E.; TISSIER, F.; DOUSSET, B.; GROUSSIN, L.; AMAR, L.; CLAUSER, E.; BERTAGNA, X.; RAGAZZON, B.; BEUSCHLEIN, F.; LIBÉ, R.; DE REYNIÈS, A.; BERTHERAT, J. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nature Genetic, New York*, v. 46, n. 6, p. 607-612, jun 2014.

ASSUMPÇÃO, J. G.; SEIDINGER, A. L.; MASTELLARO, M. J.; RIBEIRO, R. C.; ZAMBETTI, G. P.; GANTI, R.; SRIVASTAVA, K.; SHURTLEFF, S.; PEI, D.; ZEFERINO, L. C.; DUFLOTH, R. M.; BRANDALISE, S. R.; YUNES, J. A. Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. *BMC Cancer*, v. 8, p. 357, 1 dez 2008.

BENNETT, W. P.; HUSSAIN, S. P.; VAHAKANGAS, K. H.; KHAN, M. A.; SHIELDS, P. G.; HARRIS, C. C.; Molecular epidemiology of human cancer risk: gene-environment interactions and p53 mutation spectrum in human lung cancer. *The Journal of Pathology*, v.187, n. 1, p. 8-18, jan 1999.

BIRCH, J. M.; HARTLEY, A. L.; TRICKER, K. J.; PROSSER, J.; CONDIE, A.; KELSEY, A. M.; HARRIS, M.; JONES, P. H.; BINCHY, A.; CROWTHER, D.; CRAFT, A. W.; EDEN, O. B.; D. EVANS, G.R.; THOMPSON, E.; MAN, J. R.; MARTIN, J.; MITCHEL, E. L. D.; SANTIBÁÑES-KOREF, M. F. Prevalence and diversity of

constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Research*, v. 54, n. 5, p. 1298-1304, mar 1994a.

BIRCH, J. M. Familial cancer syndromes and clusters. *Brithish Medical Bulletin*, v. 50, n. 3, p. 624-639, jul 1994b.

BIRCH, J. M.; BLAIR, V.; KELSEY, A. M.; EVANS, D. G.; HARRIS, M.; TRICKER, K. J.; VARLEY, J. M. Cancer phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene*, v.17, n. 9, p. 1061-1068, set 1998.

BISCHOFF, F. Z.; YIM, S. O.; PATHAK, S.; GRANT, G.; SICILIANO, M. J.; GIOVANELLA, B. C.; STRONG, L. C.; TAINSKY, M. A. Spontaneous abnormalities in normal fibroblasts from patients with Li-Fraumeni Cancer Syndrome: Aneuploidy and immortalization. *Cancer Research*, v. 50, n. 24, p. 7979-7984, dez 1990.

BOND, G. L.; HU, W.; BOND, E. E.; ROBINS, H.; LUTZKER, S. G.; ARVA, N. C.; BARGONETTI, J.; BARTEL, F.; TAUBERT, H.; WUERL, P.; ONEL, K.; YIP, L.; HWANG, S. J.; STRONG, L. C.; LOZANO, G.; LEVINE, A. J. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*, v. 119, n. 5, p. 591-602, nov 2004.

BOUGEARD, G.; BAERT-DESURMONT, S.; TOURNIER, I.; VASSEUR, S.; MARTIN, C.; BRUGIERES, L.; CHOMPRET, A.; BRESSAC-DE PAILLERETS, B.; STOPPA-LYONNET, D.; BONAITI-PELLIE, C.; FREBOURG, T. Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *Journal of Medical Genetics*, v. 43, n. 6, p. 531-533, jun 2006.

BROSH, R.; ROTTER, V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature Reviews Cancer*, v. 9, n. 10, p. 701-713, out 2009.

CHEN, X.; STEWART, E.; SHELAT, A. A.; QU, C.; BAHRAMI, A.; HATLEY, M.; WU, G.; BRADLEY, C.; MCEVOY, J.; PAPPO, A.; SPUNT, S.; VALENTINE, M. B.; VALENTINE, V.; KRAFCIK, F.; LANG, W. H.; WIERDL, M.; TSURKAN, L.; TOLLEMAN, V.; FEDERICO, S. M.; MORTON, C.; LU, C.; DING, L.; EASTON, J.; RUSCH, M.; NAGAHAWATTE, P.; WANG, J.; PARKER, M.; WEI, L.; HEDLUND, E.; FINKELSTEIN, D.; EDMONSON, M.; SHURTLEFF, S.; BOGGS, K.; MULDER, H. YERGEAU, D.; SKAPEK, S.; HAWKINS, D. S.; RAMIREZ, N.; POTTER, P. M.; SANDOVAL, J. A.; DAVIDOFF, A. M.; MARDIS, E. R.; WILSON, R. K.; ZHANG, J.; DOWNING, J. R.; DYER, M. A. Targeting oxidative stress in embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell*, v. 24, n. 6, p. 710-724, dez 2013.

CHOMPRET, A.; ABEL, A.; STOPPA-LYONNET, D.; BRUGIÉRES, L.; PAGÉS, S.; FEUNTEUN, J.; BONAÏTI-PELLIÉ, C. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *Journal of Medical Genetics*, v. 38, n. 1, p. 43-47, jan 2001.

CLYNES, D.; HIGGS, D.; GIBBONS, R. J. The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 38, n. 9, p. 461-466, set 2013.

CUSTÓDIO, G.; PARISE, G. A.; KIESEL-FILHO, N.; KOMECHEN, H.; SABBAGA, C. C.; ROSATI, R.; GRISA, L.; PARISE, I. Z. S.; PIANOVSKI, M. A. D.; FIORI, C. M. C. M.; LEDESMA, J. A.; BARBOSA, J. R. S.; FIGUEIREDO, F. R.; SADE, E. R.; IBÁÑEZ, H.; ARRAM, S. B. I.; STINGHEN, S. T.; MENGARELLI, L. R.; FIGUEIREDO, M. M.; CARVALHO, D. C. C.; AVILLA, S. G. A.; WOISKI, T. D.; PONCIO, L. C. LIMA, G. F. R.; PONTAROLO, R.; LALLI, E.; ZHOU, Y.; ZAMBETTI, G. P.; RAUL C. RIBEIRO, R. C.; FIGUEIREDO, B. C. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *Journal of Clinical Oncology*, v. 31, n. 20, p. 2619-2626, jul 2013.

DAVISON, T. S.; YIN, P.; NIE, E.; KAY, C.; ARROWSMITH, C. H. Characterization of the oligomerization defects of two p53 mutants found in families with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome. *Oncogene*, v. 7, n. 5, p. 651-656, ago 1998.

DEHNER, L.P.; HILL, D. A. Adrenal cortical neoplasms in children: why so many carcinomas and yet so many survivors? *Pediatric and Developmental Pathology*, v. 12, n. 4, p. 284-291, jul-ago 2009.

DIGIAMMARINO, E. L.; LEE, A. S.; CADWELL, C.; ZHANG, W.; BOTHNER, B.; RIBEIRO, R. C.; ZAMBETTI, G.; KRIWACKI, R. W. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 9, n.1, p. 12-16, jan 2002.

DOGHMAN, M.; KARPOVA, T.; RODRIGUES, G. A.; ARHATTE, M.; DE MOURA, J.; CAVALLI, L. R.; VIROLLE, V.; BARBRY, P.; ZAMBETTI, G. P.; FIGUEIREDO, B. C.; HECKERT, L. L.; LALLI, E. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Molecular Endocrinology*, v. 21, n. 12, p. 2968-2987, dez 2007.

- EHRlich, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, v. 21, n. 35, p. 5400-5413, ago 2002.
- EHRlich, P. F.; ANDERSON, J. R.; RITCHEY, M. L.; DOME, J. S.; GREEN, D. M.; GRUNDY, P. E.; PERLMAN, E. J.; KALAPURAKAL, J. A.; BRESLOW, N. E.; SHAMBERGER, R. C. Clinicopathologic findings predictive of relapse in children with stage III favorable-histology Wilms tumor. *Journal of Clinical Oncology*, v. 31, n. 9, p. 1196-1201, 20 mar 2013.
- EL WAKIL, A.; DOGHMAN, M.; LATRE DE LATE, P.; ZAMBETTI, G. P.; FIGUEIREDO, B. C.; LALLI, E. Genetics and genomics of childhood adrenocortical tumors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 336, n. 1-2, p. 169–173, 10 abr 2011.
- FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, n. 2, p. 143-153, fev 2004.
- FIGUEIREDO, B. C.; STRATAKIS, C. A.; SANDRINI, R.; DELACERDA, L.; PIANOVSKI, M. A.; GIATZAKIS, C.; YOUNG, H. M.; HADDAD, B. R. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 84, n. 3, p. 1116-1121, 20 mar 1999.
- FIGUEIREDO, B. C.; CAVALLI, L. R.; PIANOVSKI, M. A.; LALLI, E.; SANDRINI, R.; RIBEIRO, R. C.; ZAMBETTI, G.; DELACERDA, L.; RODRIGUES, G. A.; HADDAD, B. R. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 90, n. 2, p. 615-619, fev 2005.
- FIGUEIREDO, B. C.; SANDRINI, R.; ZAMBETTI, G. P.; PEREIRA, R. M.; CHENG, C.; LIU, W.; LACERDA, L.; PIANOVSKI, M. A.; MICHALKIEWICZ, E.; JENKINS, J.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; MASTELLARO, M. J.; VIANNA, S.; WATANABE, F.; SANDRINI, F.; ARRAM, S. B.; BOFFETTA, P.; RIBEIRO, R. C. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *Journal of Medical Genetics*, jan 2006; v. 43, n. 1, p. 91-96, jan 2006.
- FORMENT, J.V.; KAIDI, A.; JACKSON, S. P. Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, n. 10, p. 663-670, out 2012.
- GICQUEL, C.; RAFFIN-SANSON, M. L.; GASTON, V.; BERTAGNA, X.; PLOUIN, P. F.; CHLUMBERGER, M.; LOUVEL, A.; LUTON, J. P.; LE-BOUC, Y. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in

sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 82, n. 8, p. 2559-2565, ago 1997.

GIORDANO, T. J.; THOMAS, D. G.; KUICK, R.; LIZYNESS, M.; MISEK, D. E.; SMITH, A. L.; SANDERS, D.; ALJUNDI, R. T.; GAUGER P. G.; THOMPSON, N.W.; TAYLOR, J. M.; HANASH, S. M. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *The American Journal of Pathology*, v. 162, n. 2, p. 521-31, fev 2003.

GONZALEZ, K. D.; NOLTNER, K. A.; BUZIN, C. H.; WEN-FONG, C.Y.; NGUYEN, V. Q.; HAN, J. H.; LOWSTUTER, K.; LONGMATE, J.; SOMMER, S. S.; WEITZEL, J. N. Beyond Li Fraumeni syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *Journal of Clinical Oncology*, v. 27, n. 8, p. 1250-1256, 10 mar 2009.

HAN, V. K.; LUND, P. K.; LEE, D. C.; D'ERCOLE, A. J. Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 66, n. 2, p. 422-429, fev 1988.

HAUPT, Y.; MAYA, R.; KAZAZ, A.; OREN, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, v. 387, n. 6630, p. 296-299, 15 mai 1997.

HEATON, J. H.; WOOD, M. A.; KIM, A. C.; LIMA, L. O.; BARLASKAR, F. M.; ALMEIDA, M. Q.; FRAGOSO, M. C.; KUICK, R.; LERARIO, A. M.; SIMON, D. P.; SOARES, I. C.; STARNES, E.; THOMAS, D. G.; LATRONICO, A. C.; GIORDANO, T. J.; HAMMER, G. D. Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and humans through insulin-like growth factor 2 and β -catenin. *The American Journal of Pathology*, v. 181, n. 3, p. 1017-1033, set 2012.

HUANG, Y.; HIDALGO-BRAVO, A.; ZHANG, E.; COTTON, V. E.; MENDEZ-BERMUDEZ, A.; WIG, G.; MEDINA-CALZADA, Z.; NEUMANN, R.; JEFFREYS, A. J.; WINNEY, B.; WILSON, J. F.; CLARK, D. A.; DYER, M. J.; ROYLE, N. J. Human telomeres that carry an integrated copy of human herpesvirus 6 are often short and unstable, facilitating release of the viral genome from the chromosome. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. 1, p. 315-327, 7 jan 2014.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; SAMUELS, A.; GHAFOR, A.; WARD, E.; THUN, M. J. 2003. Cancer statistics, 2003. *CA a Cancer Journal for Clinical*, v. 53, n. 1, p. 05-26, jan-fev 2003.

LANGER, P.; CUPISTI, K.; BARTSCH, D. K.; NIES, C.; GORETZKI, P. E.; ROTHMUND, M.; RÖHER, H. D. Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type 1. *World Journal of Surgery*, v. 26, n. 8, p. 891-896, 21 mai 2002.
LATRONICO, A. C.; PINTO, E. M.; DOMENICE, S.; FRAGOSO, M. C.; MARTIN, R. M.; ZERBINI, M. C.; LUCON, A. M.; MENDONCA, B. B. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 86, n. 10, p. 4970-4973, out 2001.

LAURIE, N. A.; DONOVAN, S. L.; SHIH, C. S.; ZHANG, J.; MILLS, N.; FULLER, C.; TEUNISSE, A.; LAM, S.; RAMOS, Y.; MOHAN, A.; JOHNSON, D.; WILSON, M.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; QUARTO, M.; FRANCOZ, S.; MENDRYSA, S. M.; GUY, R. K.; MARINE, J. C.; JOCHEMSEN A. G.; DYER, M. A. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature*, v. 444, n. 7115, p. 61-66, 2 nov 2006.

LEITE, J.L., STOLF, H.O.; REIS, N. A.; WARD, L. S. Human herpesvirus type 6 and type 1 infection increases susceptibility to nonmelanoma skin tumors. *Cancer Letters*, v. 224, n. 2, p. 213-219, 28 jun 2005.

LETOUZÉ, E.; ROSATI, R.; KOMECHEN, H.; DOGHMAN, M.; MARISA, L.; FLÜCK, C.; DE KRIJGER, R. R.; VAN NOESEL, M. M.; MAS, J. C.; PIANOVSKI, M. A.; ZAMBETTI, G. P.; FIGUEIREDO, B. C.; LALLI, E. SNP Array Profiling of Childhood Adrenocortical Tumors Reveals Distinct Pathways of Tumorigenesis and Highlights Candidate Driver Genes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 97, n. 7, p. E1284-E1293, jul 2012.

LI, F. P.; FRAUMENI JR, J. F.; MULVIHILL, J. J.; BLATTNER, W. A.; DREYFUS, M. G.; TUCKER, M. A.; MILLER, R. W. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Research*, v. 48, n. 18, p. 5358-5362, 15 set 1988.

LIU, G.; MCDONNELL, T. J.; LUNA, R. M. O.; KAPOOR, M.; MIMS, B.; EL-NAGGAR, A. K.; LOZANO, G. High metastatic potential in mice inheriting a targeted p53 missense mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA*, v. 97, n. 8, p. 4174-4179, 11 abr 2000.

LIU, P.K.; KRAUS, E.; WU, T. A.; STRONG, L. C.; TAINSKY, M. A. Analysis of genomic instability in Li-Fraumeni fibroblasts with germline p53 mutations. *Oncogene*, v.12, n. 11, p. 2267-2278, 6 jun 1996.

LOMAX, M. E.; BARNES, D. M.; HUPP, T. R.; PICKSLEY, S. M.; CAMPLEJOHN, R. S. Characterization of p53 oligomerization domain mutations isolated from Li-

Fraumeni and Li-Fraumeni like family members. *Oncogene*, v. 17, n. 5, p. 643-649, 6 ago 1998.

LONGUI, C. A.; LEMOS-MARINI, S. H.; FIGUEIREDO, B. C.; MENDONCA, B. B.; CASTRO, M.; LIBERATORE-JUNIOR, R.; WATANABE, C.; LANCELLOTTI, C. L.; ROCHA, M. N.; MELO, M. B.; MONTE, O.; CALLIARI, L. E.; GUERRA-JUNIOR, G.; BAPTISTA, M. T.; SBRAGIA-NETO, L.; LATRONICO, A. C.; MOREIRA, A.; TARDELLI, A. M.; NIGRI, A.; TAYMANS, S. E.; STRATAKIS, C. A. Inhibin alpha-subunit (INHA) gene and locus changes in paediatric adrenocortical tumours from TP53 R337H mutation heterozygote carriers. *Journal of Medical Genetics*, v. 41, n. 5, p. 354-9, mai 2004.

LUSTBADER, E. D.; WILLIAMS, W. R.; BONDY, M. L.; STROM, S.; STRONG, L. C. Segregation analysis of cancer in families of childhood soft-tissue-sarcoma patients. *The American Journal of Human Genetics*, v. 51, n. 2, p. 344-356, ago 1992.

MAGRO, G.; ESPOSITO, G.; CECCHETTO, G.; DALL'IGNA, P.; MARCATO, R.; GAMBINI, C.; BOLDRINI, R.; COLLINI, P.; D'ONOFRIO, V.; SALFI, N.; D'AMORE, E.; FERRARI, A.; BISOGNO, G.; ALAGGIO, R. Pediatric adrenocortical tumors: morphological diagnostic criteria and immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase type 2 and human leucocyte-associated antigen (HLA) class II antigens. Results from the Italian Pediatric Rare Tumor (TREP) Study project. *Human Pathology*, v. 43, n. 1, p. 31–39, jan 2012.

MATZUK, M. M.; FINEGOLD, M. J.; MATHER, J. P.; KRUMMEN, L.; LU, H.; BRADLEY, A. Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA*, v. 91, n. 19, p. 8817-8821, 13 set 1994.

MCINTYRE, J. F.; SMITH-SORENSEN, B.; FRIEND, S. H.; KASSELL, J.; BORRESEN, A. L.; YAN, Y. X.; RUSSO, C.; SATO, J.; BARBIER, N.; MISER, J. Germline mutations of the p53 tumor suppressor gene in children with osteosarcoma. *Journal of Clinical Oncology*, v. 12, n. 5, p. 925-930, mai 1994.

MICHALKIEWICZ, E.; SANDRINI, R.; FIGUEIREDO, B. C.; MIRANDA, E. C.; CARAN, E.; OLIVEIRA-FILHO, A. G.; MARQUES, R.; PIANOVSKI, M. A.; LACERDA, L.; CRISTOFANI, L. M.; JENKINS, J.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; RIBEIRO, R. C. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *Journal of Clinical Oncology*, v. 22, n. 5, p. 838-845, 1 mai 2004.

MOMAND, J.; ZAMBETTI, G. P.; OLSON, D. C.; GEORGE, D.; LEVINE, A. J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, v. 69, n. 7, p. 1237-1245, 26 jun 1992.

MORISSETTE, G.; FLAMAND, L. Herpesviruses and chromosomal integration. *Journal of Virology*, v. 84, n. 23, p. 12100-12109, dez 2010.

MUNIR, C. S.; NECTOUX, J. International patterns of cancer. In: Schottenfeld, D.; Fraumeni JR, J. F. (2nd eds). *Cancer epidemiology and prevention*. New York: Oxford University Press, p. 141-167, 1996.

MUSSA, A.; FERRERO, G. B.; CEOLONI, B.; BASSO, E.; CHIESA, N.; DE CRESCENZO, A.; PEPE, E.; SILENGO, M.; DE SANCTIS, L. Neonatal hepatoblastoma in a newborn with severe phenotype of Beckwith-Wiedemann syndrome. *European Journal of Pediatrics*, v. 170, n. 11, p. 1407-1411, nov 2011.

NACHEVA, E. P.; WARD, K. N.; BRAZMA, D.; VIRGILI, A.; HOWARD, J.; LEONG, H. N.; CLARK, D.A. Human herpesvirus 6 integrates within telomeric regions as evidenced by five different chromosomal Sites. *Journal of Medical Virology*, v. 80, n. 11, p. 1952-1958, nov 2008.

NICHOLS, K.E.; MALKIN, D.; GARBER, J. E.; FRAUMENI JR, J. F.; LI, F. P. Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 10, n. 2, p. 83-87, fev 2001.

NIK-ZAINAL, S.; ALEXANDROV, L. B.; WEDGE, D. C.; VAN LOO, P.; GREENMAN, C. D.; RAINE, K.; JONES, D.; HINTON, J.; MARSHALL, J.; STEBBINGS, L. A.; MENZIES, A.; MARTIN, S.; LEUNG, K.; CHEN, L.; LEROY, C.; RAMAKRISHNA, M.; RANCE, R.; LAU, K. W.; MUDIE, L. J.; VARELA, I.; MCBRIDE, D. J.; BIGNELL, G. R.; COOKE, S. L.; SHLIEN, A.; GAMBLE, J.; WHITMORE, I.; MADDISON, M.; TARPEY, P. S.; DAVIES, H. R.; PAPAEMMANUIL, E.; STEPHENS, P. J.; MCLAREN, S.; BUTLER, A. P.; TEAGUE, J. W.; JÖNSSON, G.; GARBER, J. E.; SILVER, D.; MIRON, P.; FATIMA, A.; BOYVAULT, S.; LANGERØD, A.; TUTT, A.; MARTENS, J. W.; APARICIO, S. A.; BORG, Å.; SALOMON, A. V.; THOMAS, G.; BØRRESEN-DALE, A. L.; RICHARDSON, A. L.; NEUBERGER, M. S.; FUTREAL, P. A.; CAMPBELL, P. J.; STRATTON, M. R. Breast cancer working group of the international cancer genome consortium. *Cell*, v. 149, n. 5, p. 979-993, 25 mai 2012.

OLIVIER, M.; GOLDFAR, D. E.; SODHA, N.; OHGAKI, H.; KLEIHUES, P.; HAINAUT, P.; EELES, R. A. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Research*, v. 63, n. 20, p. 6643-6650, 15 out 2003.

OLIVEIRA, C. R.; MENDONCA, B. B.; CAMARGO, O. P.; PINTO, E. M.; NASCIMENTO, S. A.; LATORRE, M. D. O. R.; ZERBINI, M. C. Classical osteoblastoma, atypical osteoblastoma, and osteosarcoma: a comparative study based on clinical, histological, and biological parameters. *Clinics, São Paulo*, v. 62, n. 2, p. 167-174, abr 2007.

OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death & Differentiation*, v. 10, n. 4, p. 431-442, abr 2003.

PARHAM, D. M. Pathologic classification of rhabdomyosarcomas and correlations with molecular studies. *Modern Pathology, Florida*, v.14, n. 5, p. 506–514, mai 2001.

PARKER, K. L.; SCHIMMER, B. P. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocrine Reviews*, v. 18, n. 3, p. 361-377, jun 1997.

PARKER, M.; CHEN, X.; BAHRAMI, A.; DALTON, J.; RUSCH, M.; WU, G.; EASTON, J.; CHEUNG, N. K.; DYER, M.; MARDIS, E. R.; WILSON, R. K.; MULLIGHAN, C.; GILBERTSON, R.; BAKER, S. J.; ZAMBETTI, G.; LLISON, D. W.; DOWNING, J. R.; ZHANG, J.; PEDIATRIC CANCER GENOME PROJECT. . The Pediatric Cancer Genome Project. Assessing telomeric DNA content in pediatric cancers using whole-genome sequencing data. *Genome Biology*, v. 13, n. 12, p. 113, 11 dez 2012.

PARRA, F. C.; AMADO, R. C.; LAMBERTUCCI, J. R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C. M.; PENA, S. D. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 100, n. 1, p. 177-182, 7 jan 2003.

PETITJEAN, A.; MATHE, E.; KATO, S.; ISHIOKA, C.; TAVTIGIAN, S. V.; HAINAUT, P.; OLIVIER, M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human Mutation*, v. 28, n. 6, p. 622-629, jun 2007.

PIANOVSKI, M. A.; CAVALLI, L. R.; FIGUEIREDO, B. C.; SANTOS, S. C.; DOGHMAN, M.; RIBEIRO, R. C.; OLIVEIRA, A. G.; MICHALKIEWICZ, E.; RODRIGUES, G. A.; ZAMBETTI, G.; HADDAD, B. R.; LALLI, E. SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. *European Journal of Cancer*, v. 42, n. 8, p. 1040-1043, mai 2006.

PIANOVSKI, M. A.; MALUF, E. M.; DE CARVALHO, D. S.; RIBEIRO, R. C.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; BOFFETTA, P.; ZANCANELLA, P.; FIGUEIREDO, B.

C. Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. *Pediatr Blood Cancer*, v. 47, n. 1, p. 56-60, jul 2006.

PINTO, E. M.; BILLERBECK, A. E.; VILLARES, M. C.; DOMENICE, S.; MENDONCA, B. B.; LATRONICO, A. C. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, São Paulo, v. 48, n. 5, p. 647-650, out 2004.

PINTO, E. M.; BILLERBECK, A. E.; FRAGOSO, M. C.; MENDONCA, B. B.; LATRONICO, A. C. Deletion mapping of chromosome 17 in benign and malignant adrenocortical tumors associated with the Arg337His mutation of the p53 tumor suppressor protein. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 90, n. 8, p. 2976-2981, mai 2006.

PINTO, E.M.; RIBEIRO, R.C.; FIGUEIREDO, B.C.; ZAMBETTI, G.P. TP53-Associated Pediatric Malignancies. *Genes Cancer*, v. 2, n. 4, p. 485-90, abr 2011a.

PINTO, E. M.; RIBEIRO, R. C.; KLETTER, G. B.; LAWRENCE, J. P.; JENKINS, J. J.; WANG, J.; SHURTLEFF, S.; MCGREGOR, L.; KRIWACKI, R. W.; ZAMBETTI, G. P. Inherited germline TP53 mutation encodes a protein with an aberrant C-terminal motif in a case of pediatric adrenocortical tumor. *Familial Cancer*, v. 10, n. 1, p. 141-146, mar 2011b.

POUNDS, S.; CHENG, C.; LI, S.; LIU, Z.; ZHANG, J.; MULLIGHAN, C. A genomic random interval model for statistical analysis of genomic lesion data. *Bioinformatics*, v. 29, n. 17, p. 2088-2095, set 2013.

RAINIER, S.; JOHNSON, L. A.; DOBRY, C. J.; PING, A. J.; GRUNDY, P. E.; FEINBERG, A. P. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature*, v. 362, n. 6422, p. 747-749, 22 abr 1993.

REED, D.; SHEN, Y.; SHELAT, A. A.; ARNOLD, L. A.; FERREIRA, A. M.; ZHU, F.; MILLS, N.; SMITHSON, D. C.; REGNI, C. A.; BASHFORD, D.; CICERO, S. A.; SCHULMAN, B. A.; JOCHEMSEN, A. G.; GUY, R. K.; DYER, M. A. Identification and characterization of the first small molecule inhibitor of MDMX. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 14, p. 10786-10796, 2 abr 2010.

RIBEIRO, R. C.; SANDRINI, F.; FIGUEIREDO, B. C.; ZAMBETTI, G. P.; MICHALKIEWICZ, E.; LAFFERTY, A. R.; DELACERDA, L.; RABIN, M.; CADWELL,

C.; SAMPAIO, G.; CAT, I.; STRATAKIS, C. A.; SANDRINI, R. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 98, n. 16, p. 9330-9335, 31 jul 2001.

RIBEIRO, R. C., PINTO, E. M., ZAMBETTI, G. P. & RODRIGUEZ-GALINDO, C. The International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry initiative: contributions to clinical, biological, and treatment advances in pediatric adrenocortical tumors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 351, n. 1, p. 37-43, 31 mar 2012.

ROSATI, R.; CERRATO, F.; DOGHMAN, M.; PIANOVSKI, M. A.; PARISE, G. A.; CUSTÓDIO, G.; ZAMBETTI, G. P.; RIBEIRO, R. C.; RICCIO, A.; FIGUEIREDO, B. C.; LALLI, E. High frequency of loss of heterozygosity at 11p15 and IGF2 overexpression are not related to clinical outcome in childhood adrenocortical tumors positive for the R337H TP53 mutation. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, v. 186, n. 1, p. 19-24, out 2008.

RUIJS, M. W.; VERHOEF, S.; ROOKUS, M. A.; PRUNTEL, R.; VAN DER HOUT, A. H.; HOGERVORST, F. B.; KLUIJT, I.; SIJMONS, R. H.; AALFS, C. M.; WAGNER, A.; AUSEMS, M. G.; HOOGERBRUGGE, N.; VAN ASPEREN, C. J.; GOMEZ GARCIA, E. B.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; TEN KATE, L. P.; MENKO, F. H.; VAN'T VEER, L. J. TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *Journal of Medical Genetics*, v. 47, n. 6, p. 421-428, jun 2010.

RUSSELL-SWETEK, A.; WEST, A. N.; MINTER, J. E.; JENKINS, J.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; RIBEIRO, R.; ZAMBETTI, G. P. Identification of a novel TP53 germline mutation E285V in a rare case of paediatric adrenocortical carcinoma and choroid plexus carcinoma. *Journal of Medical Genetics*, v. 45, n. 9, p. 603-606, set 2008.

SEIDINGER, A. L.; MASTELLARO, M. J.; FORTES, F. P.; ASSUMPÇÃO, J. G.; CARDINALLI, I. A.; GANAZZA, M. A.; RIBEIRO, R. C.; BRANDALISE, S. R.; AGUIAR S. S.; YUNES, J. A. Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil. *Cancer*, v. 117, n. 10, p. 2228-2235, 15 mai 2011.

SHVARTS, A.; STEEGENGA, W. T.; RITECO, N.; VAN LAAR, T.; DEKKER, P.; BAZUINE, M.; VAN HAM, R. C.; VAN DER HOUVEN VAN OORDT, W.; HATEBOER, G.; VAN DER, EB. A. J.; JOCHEMSEN, A. G. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *The Embo Journal*, v. 15, n. 19, p. 5349-5357, 1 out 1996.

SMITH, A. C.; SQUIRE, J. A.; THORNER, P.; ZIELENSKA, M.; SHUMAN, C.; GRANT, R.; CHITAYAT, D.; NISHIKAWA, J. L.; WEKSBERG, R. Association of alveolar rhabdomyosarcoma with the Beckwith-Wiedemann syndrome. *Pediatric and Developmental Pathology*, v. 4, n. 6, p. 550-558, nov-dez 2001.

STEENMAN, M.; WESTERVELD, A.; MANNENS, M. Genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome-associated tumors: common genetic pathways. *Genes Chromosomes Cancer*, v. 28, n. 1, p. 01-13, mai 2000.

STRONG, L. C.; WILLIAMS, W. R.; TAINSKY, M. A.; The Li-Fraumeni syndrome: from clinical epidemiology to molecular genetics. *American Journal of Epidemiology*, v. 135, n. 2, p. 190-199, 15 jan 1992.
SUN, F. L.; DEAN, W. L.; KELSEY, G.; ALLEN, N. D.; REIK, W. Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature*, v. 389, n. 6653, p. 809-815, 23 out 1997.

TEINTURIER, C.; PAUCHARD, M. S.; BRUGIERES, L.; LANDAIS, P.; CHAUSSAIN, J. L.; BOUGNERES, P. F. Clinical and prognostic aspects of adrenocortical neoplasms in childhood. *Medical and Pediatric Oncology*, v. 32, n. 2, p. 106-111, fev 1999.

VALENTIJN, L. J.; PAUCHARD, M. S.; BRUGIÈRES, L.; LANDAIS, P.; CHAUSSAIN, J. L.; BOUGNÈRES, P.F. Functional MYCN signature predicts outcome of neuroblastoma irrespective of MYCN amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 109, n. 47, p. 19190-19195, 20 nov 2012.

VARLEY, J. M.; MCGOWN, G.; THORNCROFT, M.; JAMES, L. A.; MARGISON, G. P.; FORSTER, G.; EVANS, D. G.; HARRIS, M.; KELSEY, A. M.; BIRCH, J. M. Are there low-penetrance TP53 alleles? Evidence from childhood adrenocortical tumors. *The American Journal of Human Genetics*, V, 65, n. 4, p. 995-1006, out 1999.

VARLEY, J. M. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Human Mutation*, v. 21, n. 3, p. 313-320, mar 2003.

VELAZQUEZ-FERNANDEZ, D.; LAURELL, C.; GELI, J.; HÖÖG, A.; ODEBERG, J.; KJELLMAN, M.; LUNDEBERG, J.; HAMBERGER, B.; NILSSON, P.; BÄCKDAHL, M. Expression profiling of adrenocortical neoplasms suggests a molecular signature of malignancy. *Surgery*, v. 138, n. 6, p. 1087–1094, dez 2005.

VOUSDEN, K. H.; LU, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, n.8, p. 594-604, ago 2002.

VOUSDEN, K. H.; LANE, D. P. p53 in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 8, n. 4, p. 275-83, abr 2007.

WADE, M.; WAHL, G. M. Targeting Mdm2 and Mdmx in cancer therapy: better living through medicinal chemistry? *Molecular Cancer Research*, v. 7, n. 1, p. 01-11, jan 2009.

WAGNER, J.; PORTWINE, C.; RABIN, K.; LECLERC, J. M.; NAROD, S. A.; MALKIN, D. High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 86, n. 22, p. 1707-1710, 16 nov 1994.

WASSERMAN, J. D.; ZAMBETTI, G. P.; MALKIN, D. Towards an understanding of the role of p53 in adrenocortical carcinogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 351, n. 1, p. 101-110, 31 mar 2012.

WEISZ, L.; OREN, M.; ROTTER, V. Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene*, v. 26, n. 15, p. 2202-2211, 2 abr 2007.

WEKSBERG, R.; SHUMAN, C.; BECKWITH, J. B. Beckwith-Wiedemann syndrome. *European Journal of Human Genetics*, v. 18, n. 1, p. 08-14, jan 2010.

WEST, A. N.; RIBEIRO, R. C.; JENKINS, J.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; FIGUEIREDO, B. C.; KRIWACKI, R.; ZAMBETTI, G. P. Identification of a novel germ line variant hotspot mutant p53-R175L in pediatric adrenal cortical carcinoma. *Cancer Research*, v. 66, n. 10, p. 5056-5062, 15 mai 2006.

WEST, A. N.; NEALE, G. A.; POUNDS, S.; FIGUEREDO, B. C.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; PIANOVSKI, M. A.; OLIVEIRA-FILHO, A. G.; MALKIN, D.; LALLI, E.; RIBEIRO, R. C.; ZAMBETTI, G. P. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Research*, v. 67, n. 2, p. 600-608, 15 jan 2007.

YAN, W.; CHEN, X.; Characterization of functional domains necessary for mutant p53 gain of function. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 19, p. 14229-14238, 7 mai 2010.

ZAMBETTI, G. P.; The p53 mutation "gradient effect" and its clinical implications. *Journal of Cellular Physiology*, v. 213, n. 2, p. 370-373, nov 2007.

ZHANG, J.; DING, L.; HOLMFELDT, L.; WU, G.; HEATLEY, S. L.; PAYNE-TURNER, D.; EASTON, J.; CHEN, X.; WANG, J.; RUSCH, M.; LU, C.; CHEN, S. C.; WEI, L.; COLLINS-UNDERWOOD, J. R.; MA, J.; ROBERTS, K. G.; POUNDS, S. B.; ULYANOV, A.; BECKSFORT, J.; GUPTA, P.; HUETHER, R.; KRIWACKI, R. W.; PARKER, M.; MCGOLDRICK, D. J.; ZHAO, D.; ALFORD, D.; ESPY, S.; BOBBA, K. C.; SONG, G.; PEI, D.; CHENG, C.; ROBERTS, S.; BARBATO, M. I.; CAMPANA, D.; COUSTAN-SMITH, E.; SHURTLEFF, S. A.; RAIMONDI, S. C.; KLEPPE, M.; COOLS, J.; SHIMANO, K. A.; HERMISTON, M. L.; DOULATOV, S.; EPPERT, K.; LAURENTI, E.; NOTTA, F.; DICK, J. E.; BASSO, G.; HUNGER, S. P.; LOH, M. L.; DEVIDAS, M.; WOOD, B.; WINTER, S.; DUNSMORE, K. P.; FULTON, R. S.; FULTON, L. L.; HONG, X.; HARRIS, C. C.; DOOLING, D. J.; OCHOA, K.; JOHNSON, K. J.; OBENAUER, J. C.; EVANS, W. E.; PUI, C. H.; NAEVE, C. W.; LEY, T. J.; MARDIS, E. R.; WILSON, R. K.; DOWNING, J. R.; MULLIGHAN, C. G. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, v. 481, n. 7380, p. 157-163, 11 jan 2012a.

ZHANG, J.; BENAVENTE, C. A.; MCEVOY, J.; FLORES-OTERO, J.; DING, L.; CHEN, X.; ULYANOV, A.; WU, G.; WILSON, M.; WANG, J.; BRENNAN, R.; RUSCH, M.; MANNING, A. L.; MA, J.; EASTON, J.; SHURTLEFF, S.; MULLIGHAN, C.; POUNDS, S.; MUKATIRA, S.; GUPTA, P.; NEALE, G.; ZHAO, D.; LU, C.; FULTON, R. S.; FULTON, L. L.; HONG, X.; DOOLING, D. J.; OCHOA, K.; NAEVE, C.; DYSON, N. J.; MARDIS, E. R.; BAHRAMI, A.; ELLISON, D.; WILSON, R. K.; DOWNING, J. R.; DYER, M. A. A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses. *Nature*, v. 481, n. 7381, p. 329-334, 11 jan 2012b.

APÊNDICE

FIGURAS SUPLEMENTARES

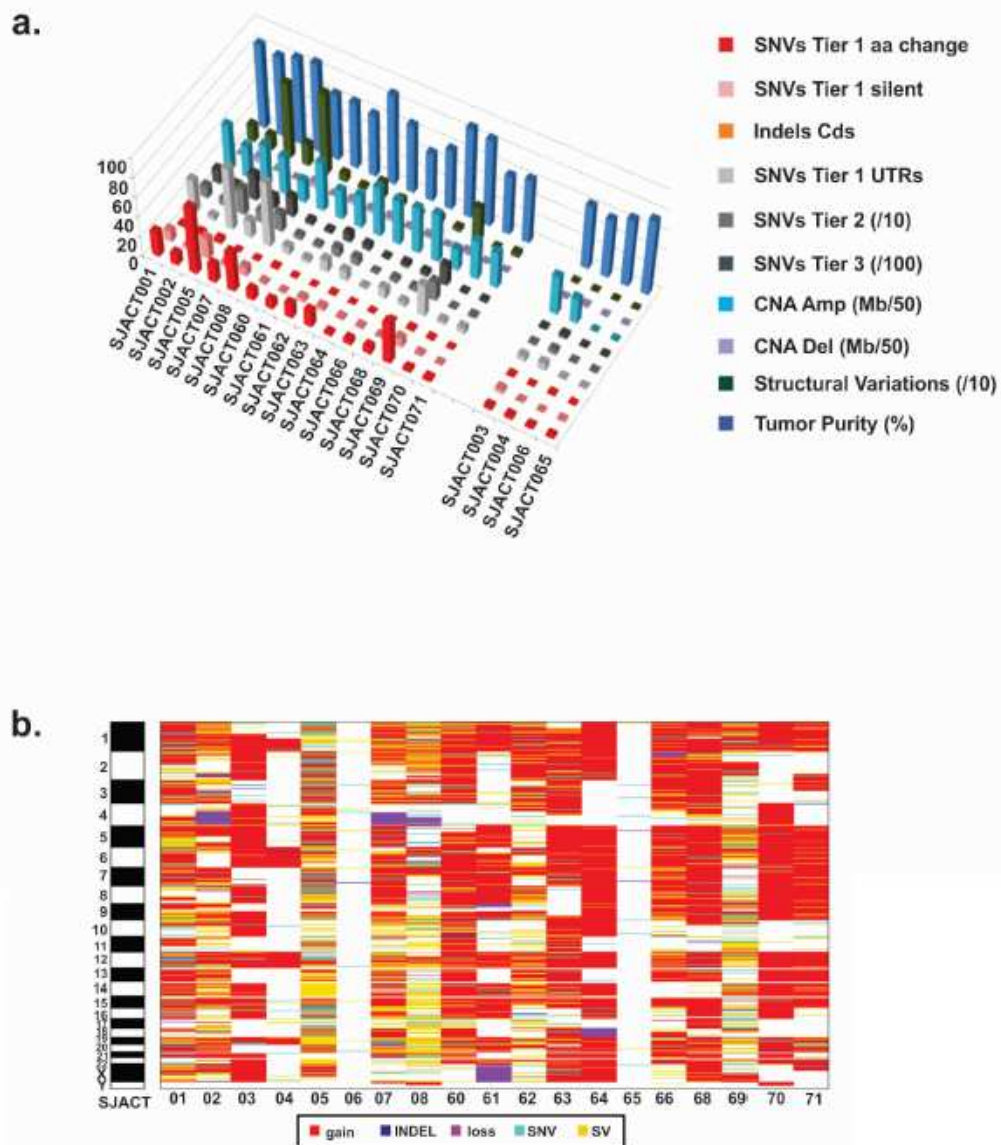
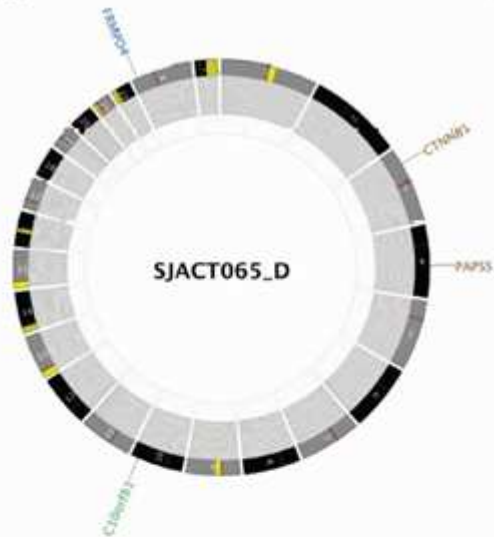
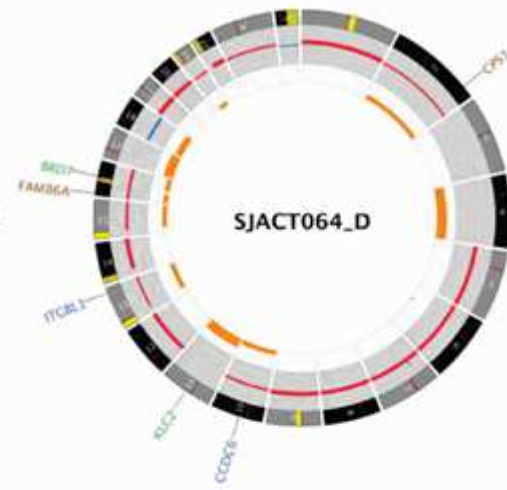


Figura Suplementar 1 - Espectro de mutações no TCA pediátrico. (a) Número de variações na sequência (SNVs e indels), variações estruturais (SVs), e alterações no número de cópias (CNAs) derivadas do sequenciamento do genoma inteiro. Os primeiros 15 casos tinham mutações germinativas no TP53; os quatro finais tinham o gene TP53 selvagem. (b) O Heat mapa dos ganhos, perdas, indels, SNVs, e SVs em toda a sequência do genoma inteiro de TCA pediátrico (Indels = inserção ou deleção).

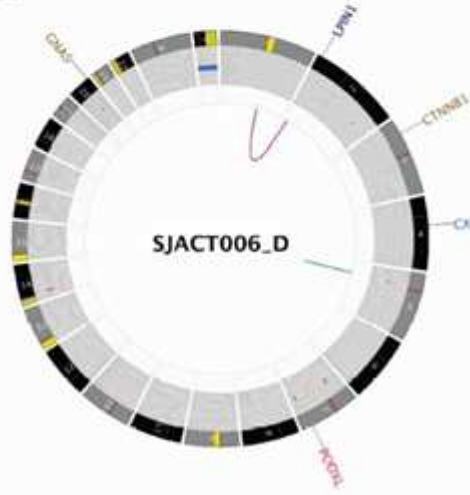
WT TP53



R337H TP53



WT TP53



WT TP53

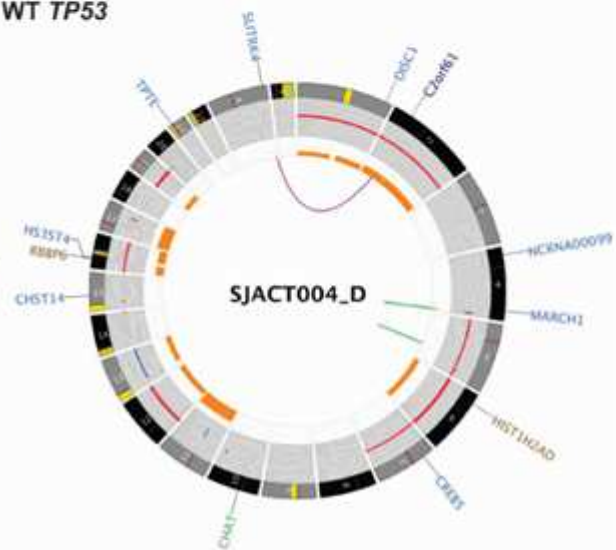
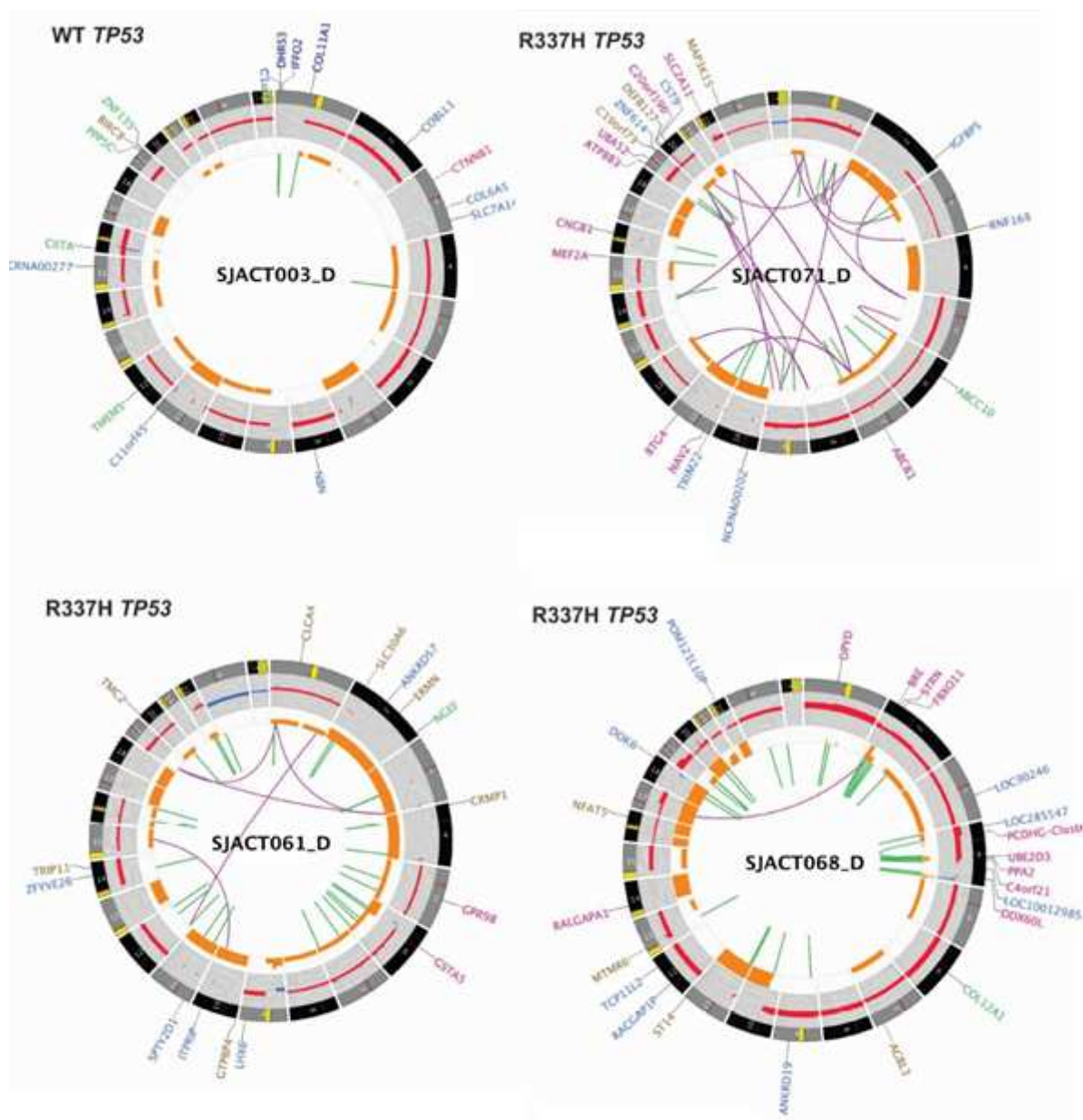
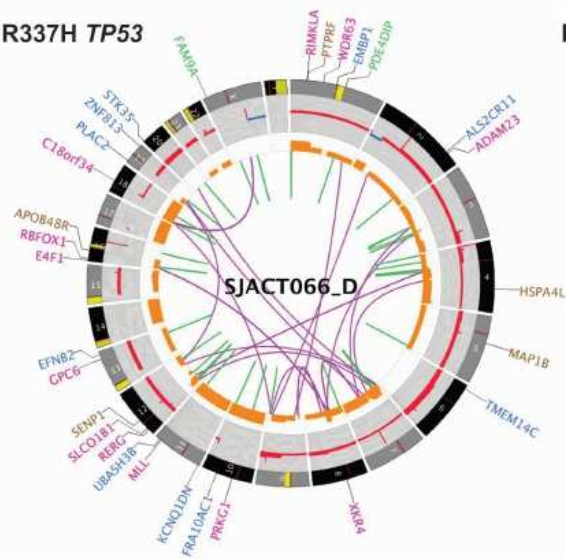


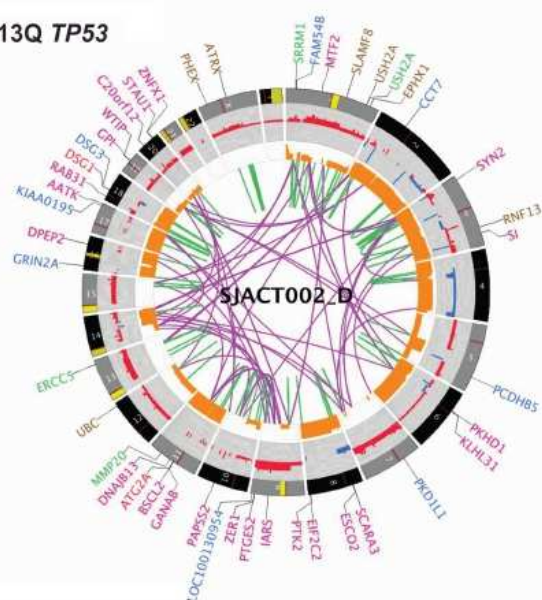
Figura suplementar 2a e 2b



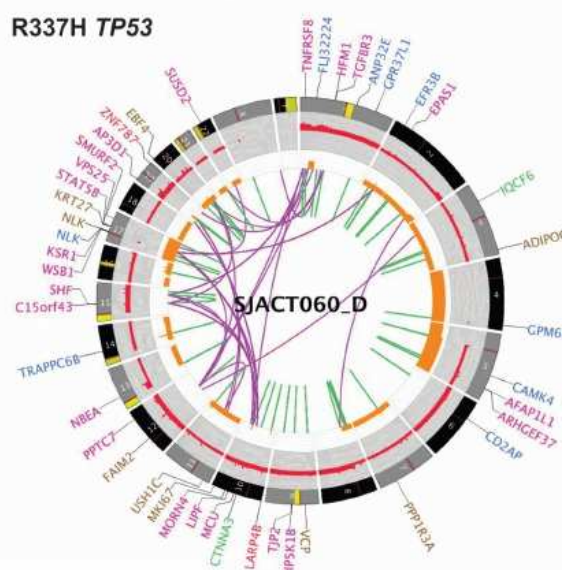
R337H TP53



R213Q TP53



R337H TP53



I332F TP53

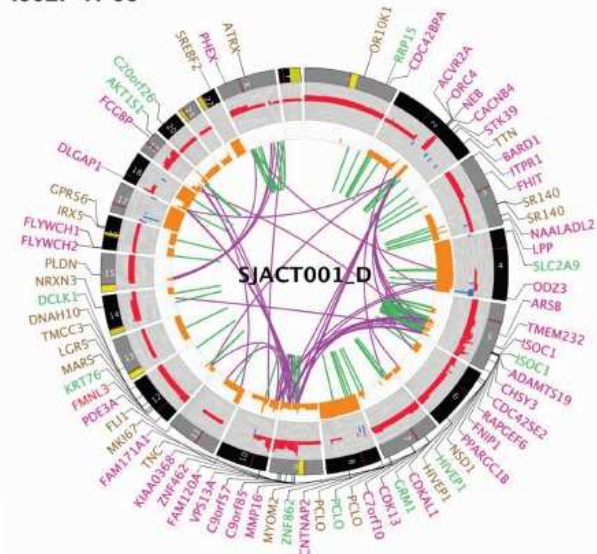


Figura suplementar 2e e 2f

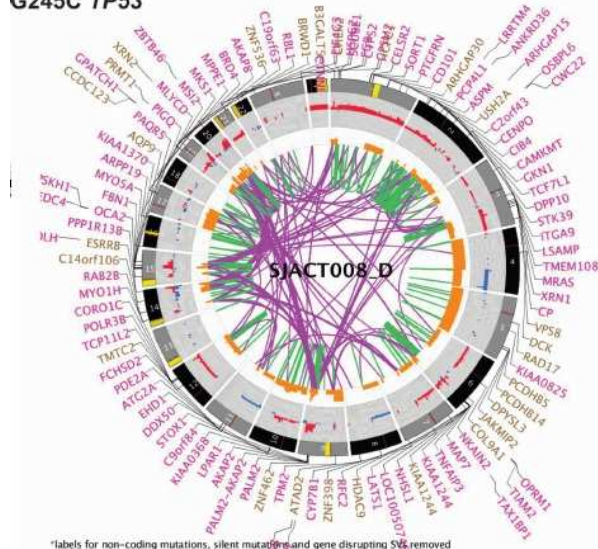
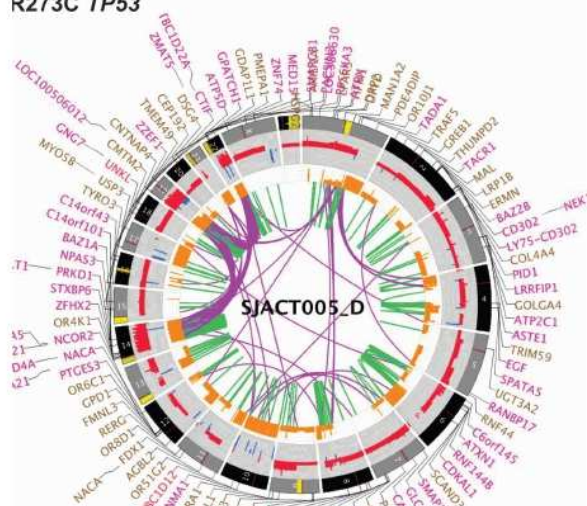
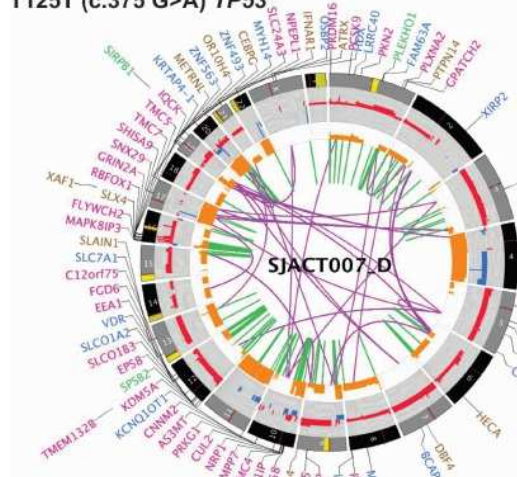
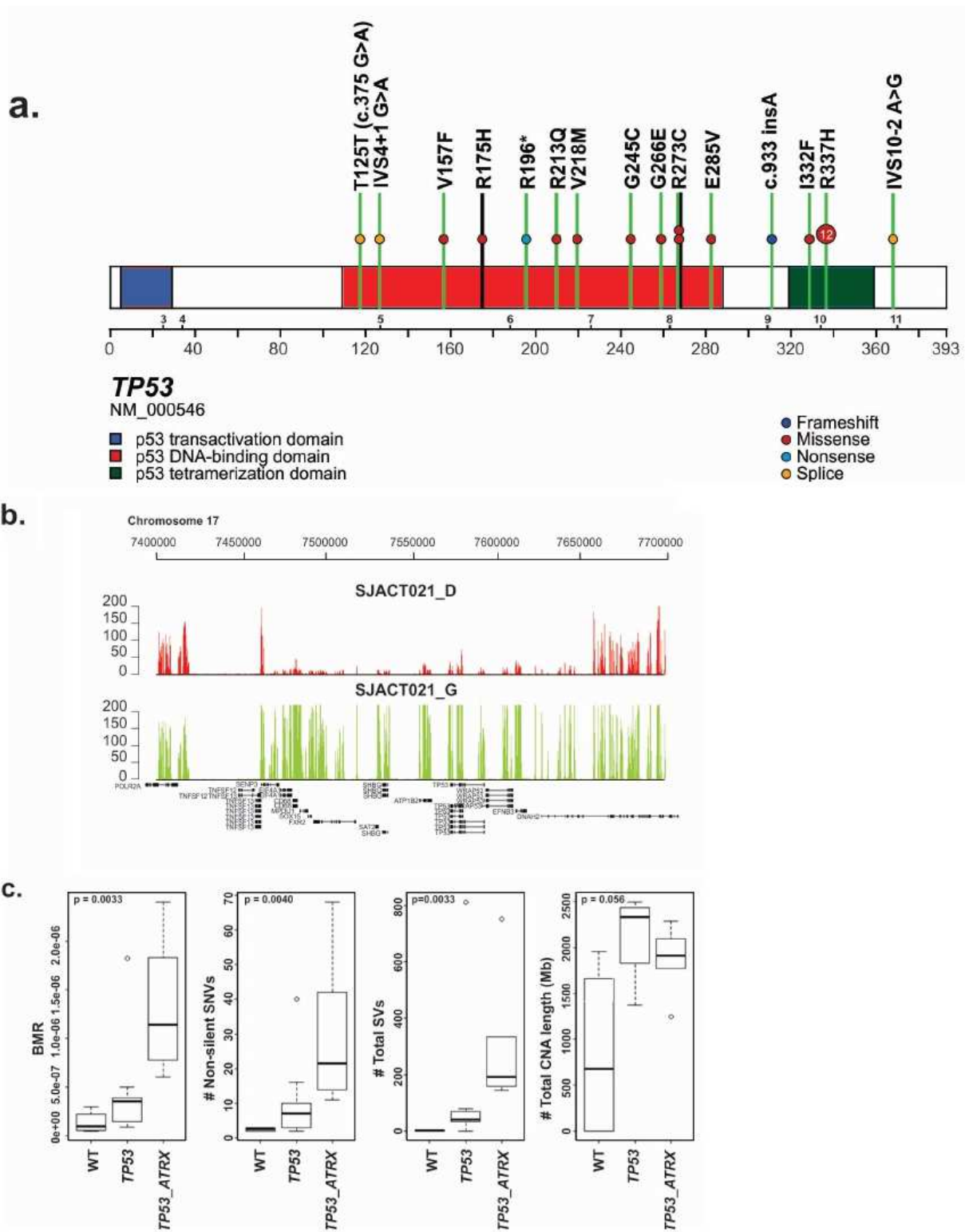


Figura suplementar 2g e 2h

Figuras Suplementares 2 a, b, c, d, e, f, g, h - Plotagem das alterações genéticas identificadas em TCA pediátricos por WGS. Estão descritos CNAs, translocações intra e inter cromossômicas e alterações na sequência identificada por WGS. LOH, laranja; amplificação, vermelho; deleção, azul. Mutações: variações silenciosas de nucleotídeo único (SNVs), verde; SNVs não silenciosa, marrom; indels, vermelho. Genes em pontos de quebra, variantes estruturais incluem genes envolvidos em fusões in-frame (rosa) e outros (azul). Os casos SJACT062, SJACT063, SJACT069 e SJACT070 estão representados na Figura 3.



Figuras Suplementares 3 a, b, c - Mutações no gene TP53 em TCA pediátricos. (a) Diagrama de mutações germinativas no TP53 (linhas verdes) e somáticas (linhas pretas) detectadas por WGS e WES. (b) Sequenciamento do genoma inteiro com cobertura de 17p13 em SJACT021 [tumor (D) e linhagem germinativa (G)], com uma deleção homozigótica de aproximadamente 200 kb abrangendo TP53 na amostra tumoral. (c) Boxplots de BMR, SNVs não-silenciosas, SVs totais e comprimento CNA total em TCA pediátricos associados com o TP53 tipo selvagem (WT), TP53 mutante (TP53), e ambos mutante TP53 mais ATRX (TP53-ATRX).

Figura Suplementar 4 - Status de TP53, CTNNB1 e cromossomo 11p15 em TCA do grupo de validação. (a) Diagrama de mutações germinativas no *TP53*, (linhas verdes) e somáticas (pretas), detectadas pelo método de sequenciamento de Sanger. (b) Distribuição de mutações em CTNNB1. (c) Representação esquemática da análise de microssatélites do cromossomo 11p15 em 22 TCAs pediátricos. A seleção contra o alelo materno foi observada em todos os casos informativos com DNA parental disponível (n = 15, roxo).

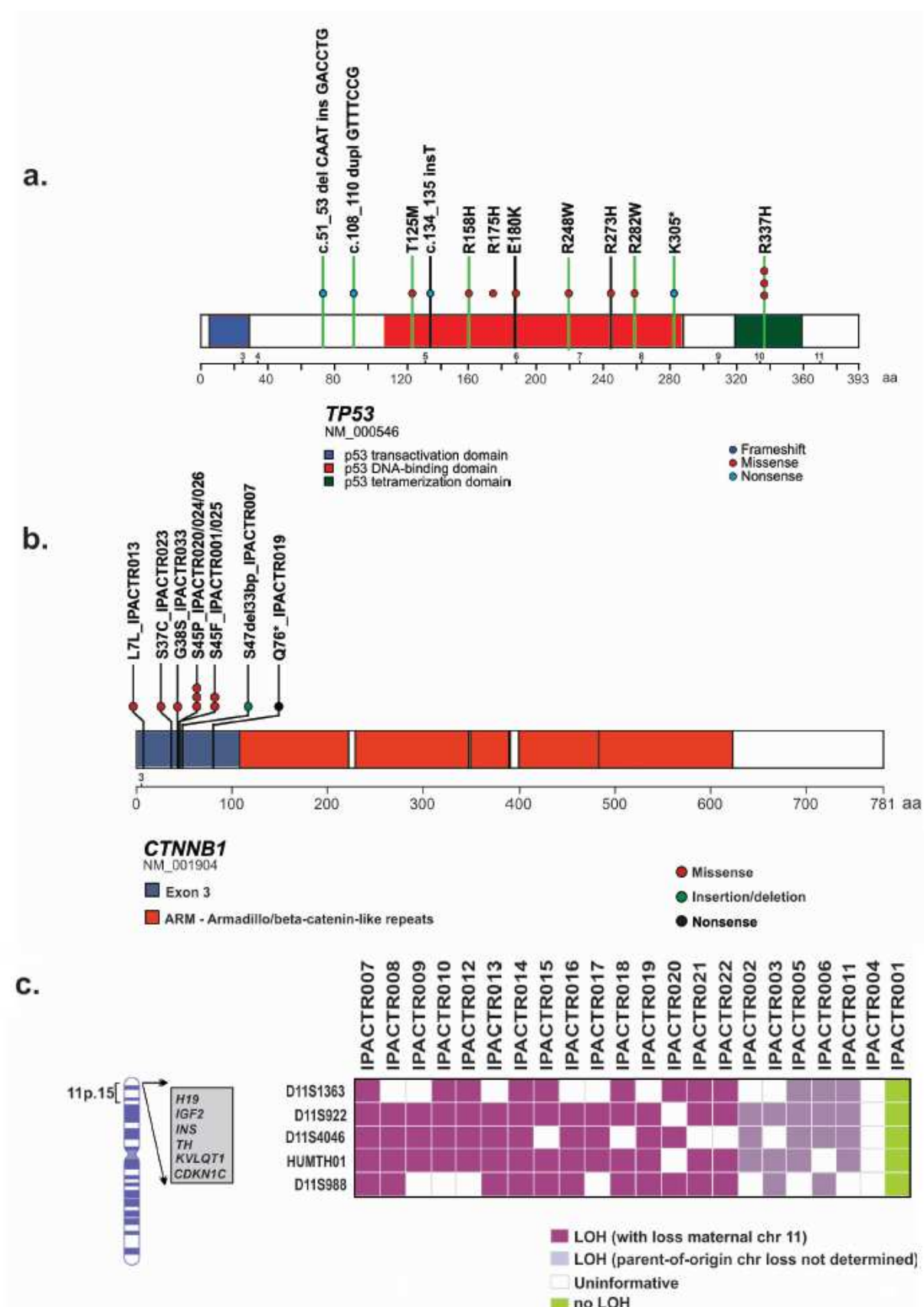


Figura suplementar 4

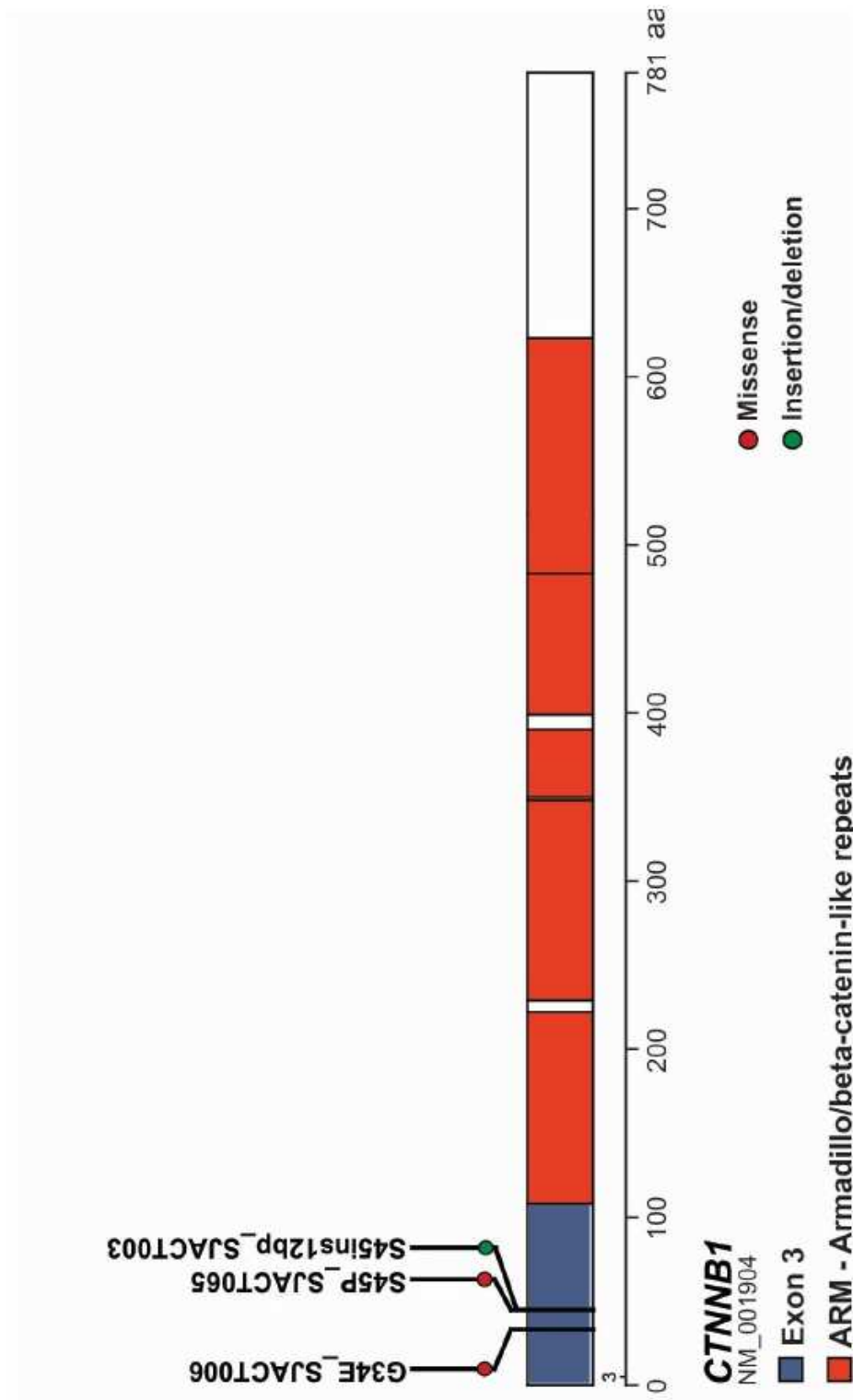


Figura suplementar 5

Figura Suplementar 5 - Distribuição de mutações CTNNB1 em TCAs pediátricos dos grupos WGS e WES. Mutação missense e frame-shift no CTNNB1 foram detectadas no éxon 3 e foram anteriormente relatadas como sendo ativadoras.

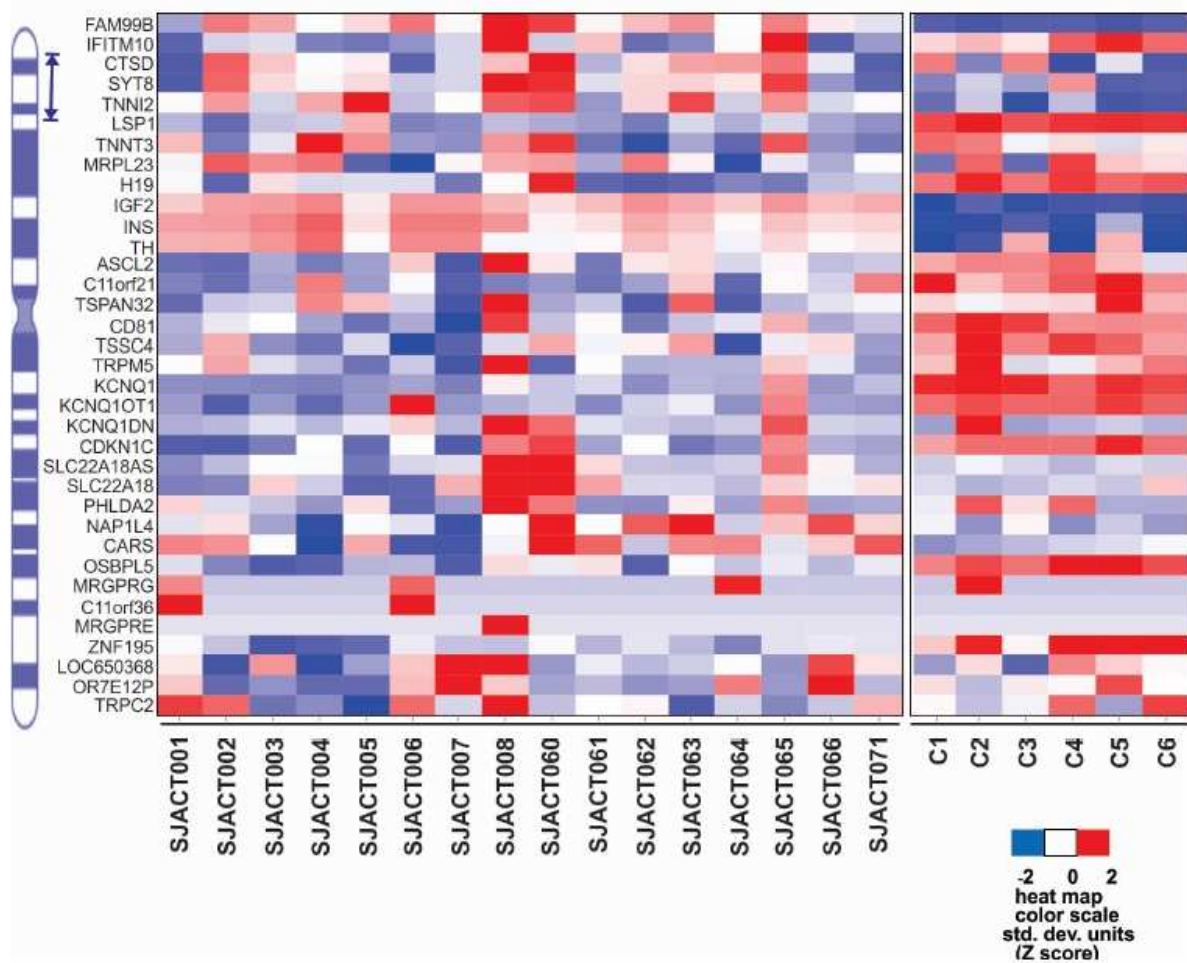
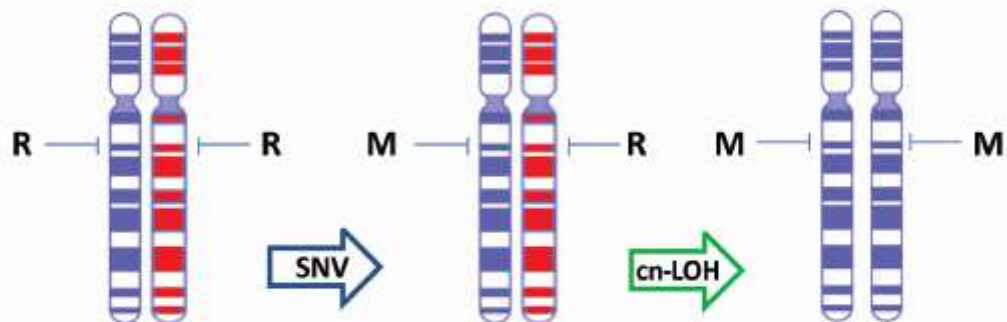


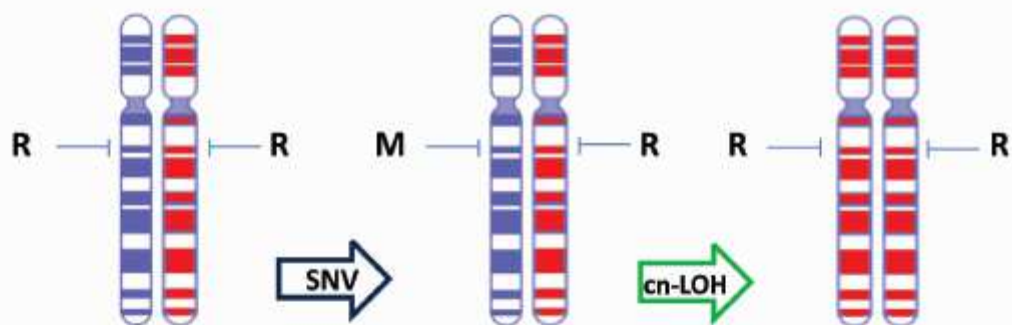
Figura Suplementar 6 - Sequenciamento do transcriptoma de genes selecionados na região de genes imprintados *em* 11p15. O IGF2 foi identificado consistentemente superexpresso em todos os casos. Amostras de tecido adrenocorticais normais foram incluídas como controles basais (C1- 6).

a.

Mutation followed by LOH (MAF=1)



Mutation followed by LOH (MAF=0)



LOH followed by Mutation (MAF=0.5)

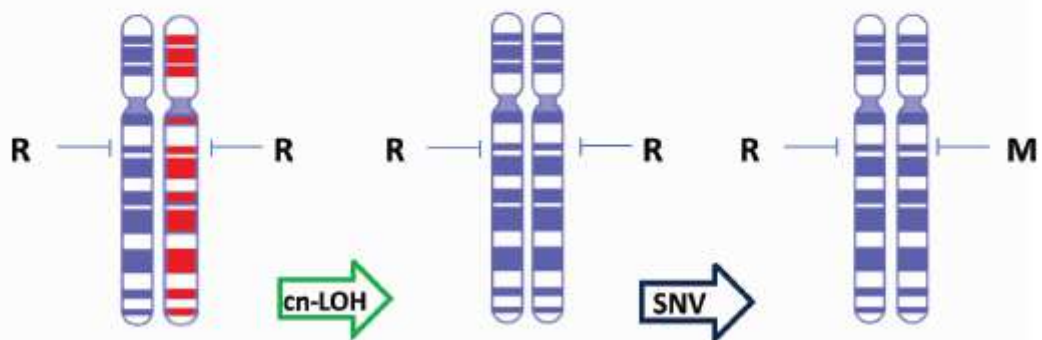


Figura suplementar 7a

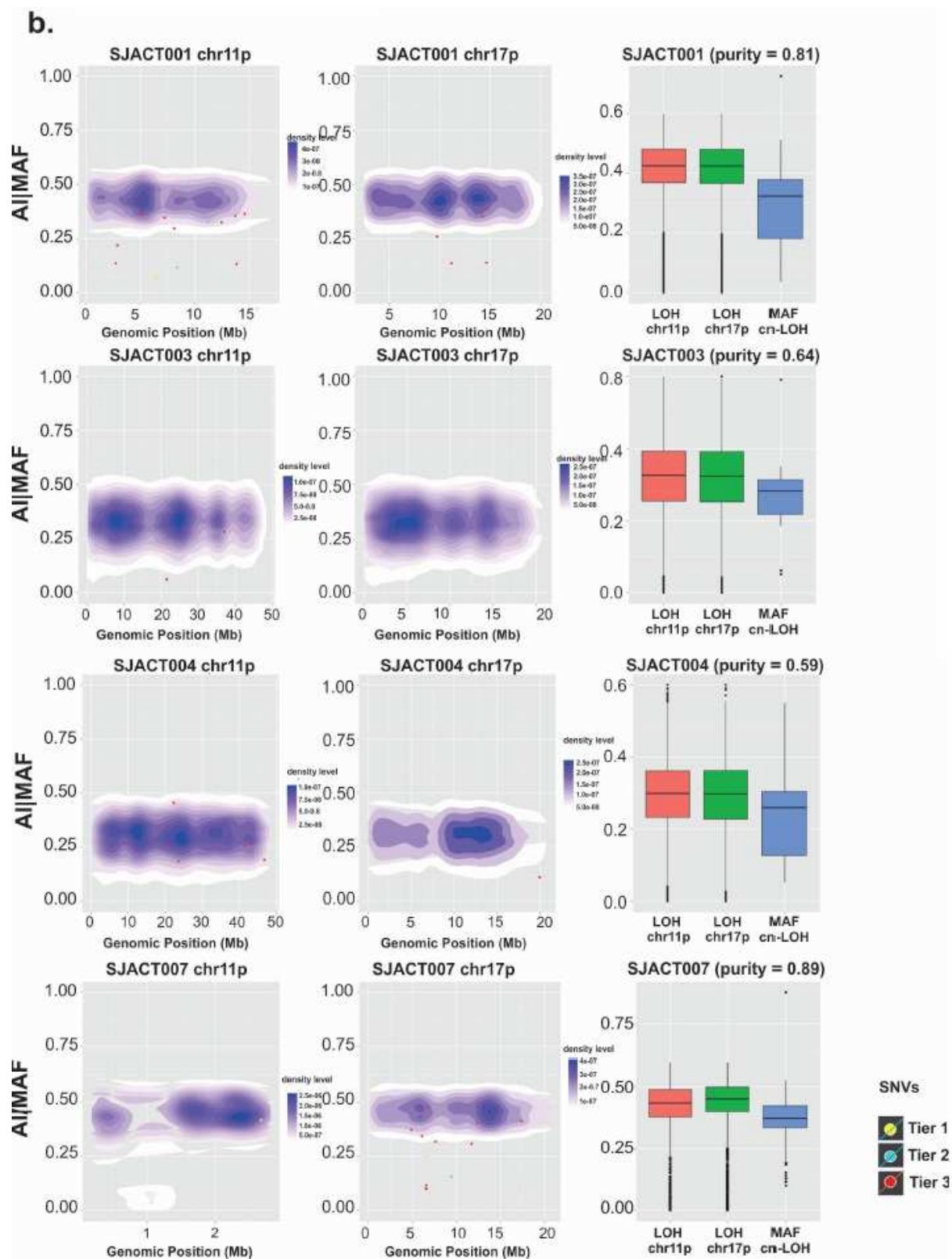
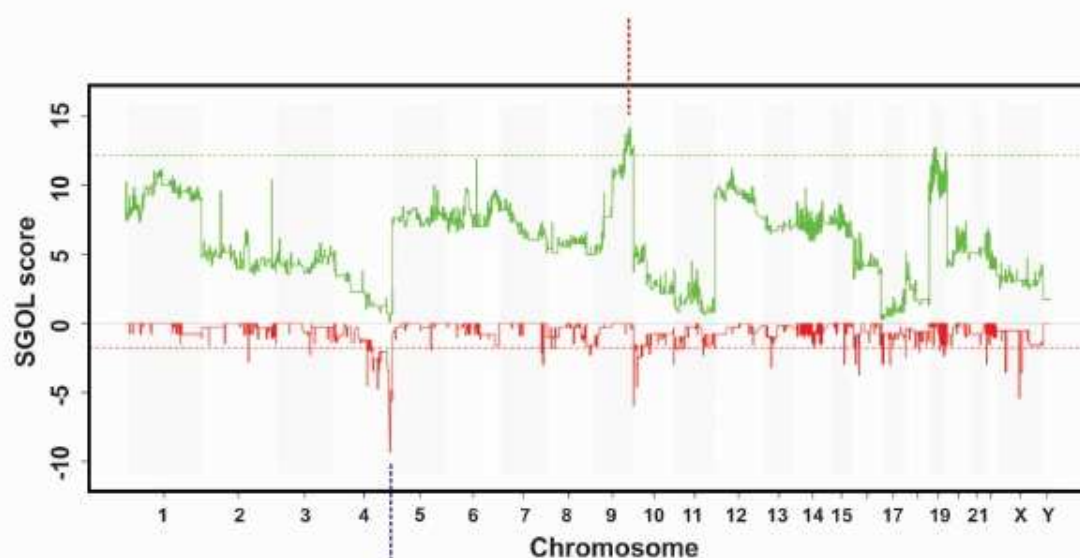


Figura suplementar 7b

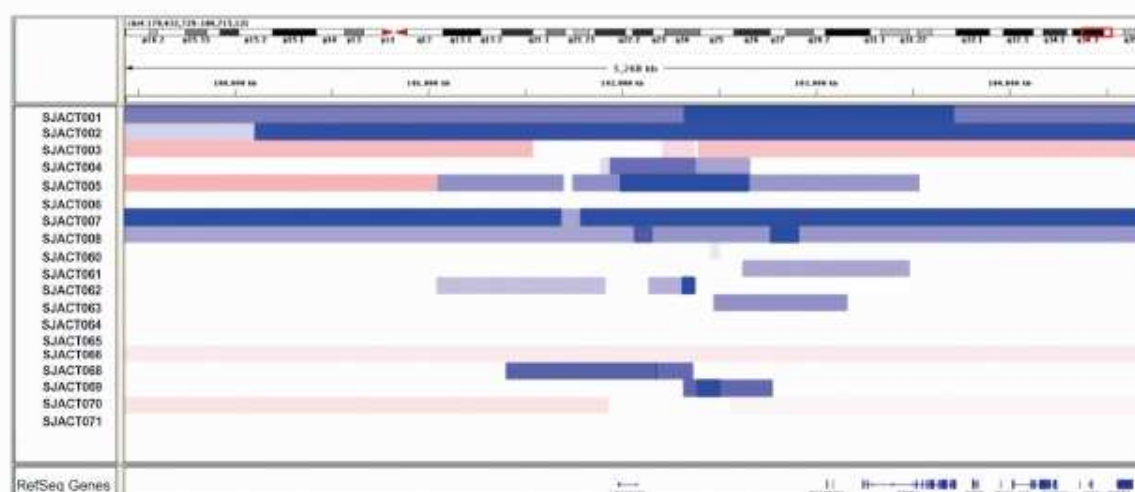
Figura Suplementar 7 - Cronologia da cn-LOH em TCA pediátricos no grupo de WGS. (a) Cenários hipotéticos da cronologia do cn-LOH e acúmulo de SNV. A fração do alelo mutante (MAF) de SNVs na região cn-LOH foi usada para determinar a ordem temporal de cn-LOH e acúmulo de SNV. Painéis superior e central: A SNV somática ocorreu antes de cn-LOH. Se cn-LOH selecionou o cromossomo portador do alelo mutante (M), a MAF é 1 (painel superior). Se cn-LOH selecionou o cromossomo com o alelo de referência (R), o MAF é 0 (painel do meio). Painel inferior: Quando uma SNV foi acumulada após cn-LOH, a MAF é 0,5. (b) Momento de cn-LOH em TCA pediátricos no grupo WGS. AI \equiv desequilíbrio alélico; MAF \equiv fração do alelo mutante; chr \equiv cromossomo; LOH \equiv perda de heterozigose.

Figura Suplementar 8 - Mudanças no número de cromossomos dos TCAs pediátricos. (a) Análise de GISTIC mostrando ganhos no número de cópias (verde) e perdas (vermelho) em todos os cromossomos. As linhas tracejadas representam o limite de significância estatística. SGOL, segmentos de ganho ou perda. (b) Perfil da alteração no número de cópias (CNA) da defecção focal de 4q34. (c) perfil da CNA para o ganhos em 9q.

a.



b.



c.

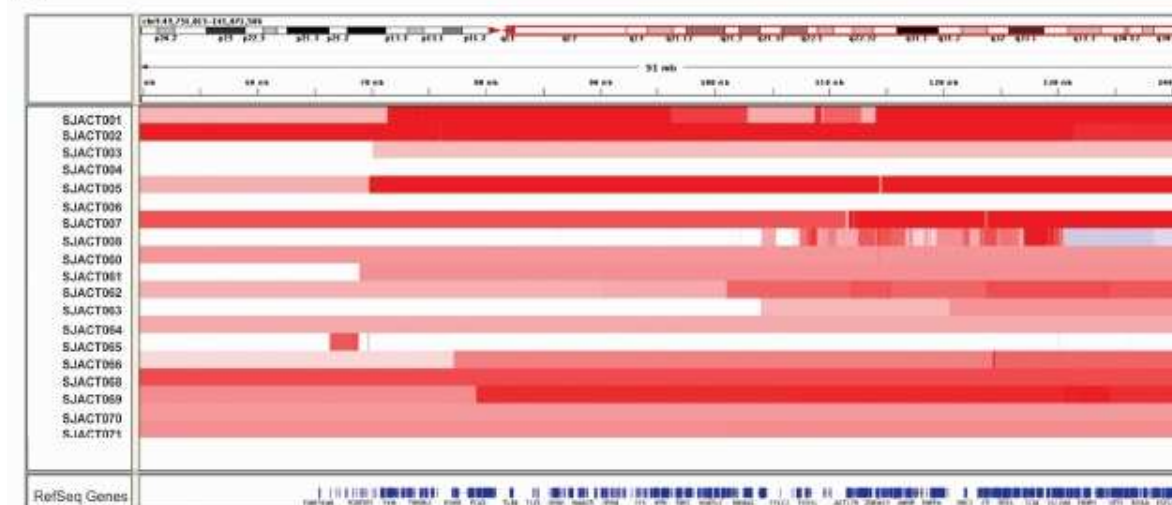
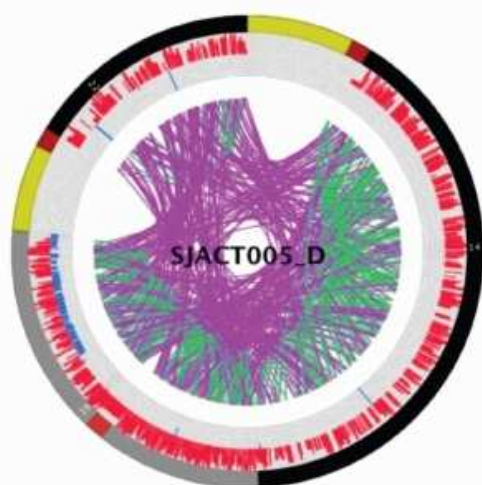


Figura suplementar 8

a.



b.

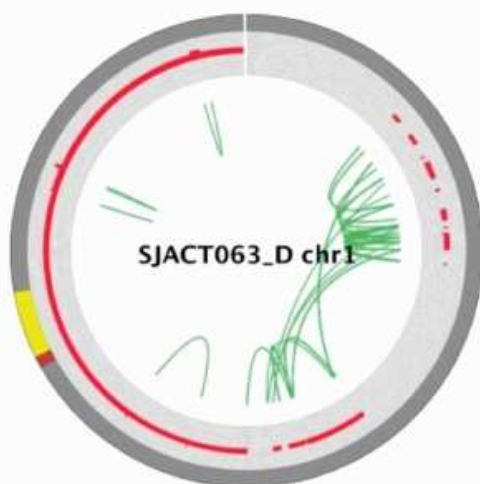


Figura suplementar 9

Figura Suplementar 9 - Assinaturas de chromothripsis no TCA pediátrico. (a) Rearranjos envolvendo vários cromossomos em SJACT005. (b) Rearranjos restritos ao cromossomo 1 no SJACT063.

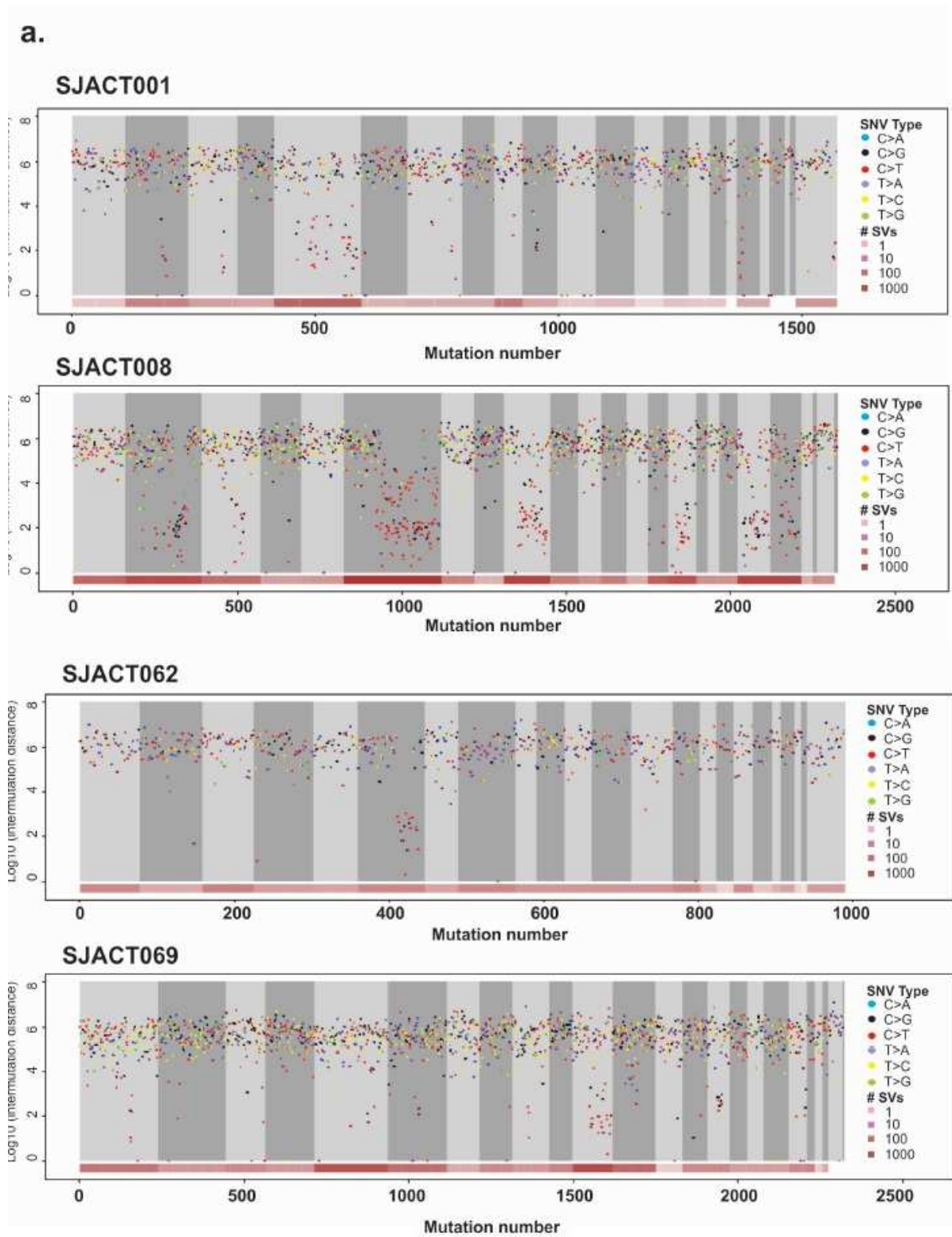


Figura suplementar 10a

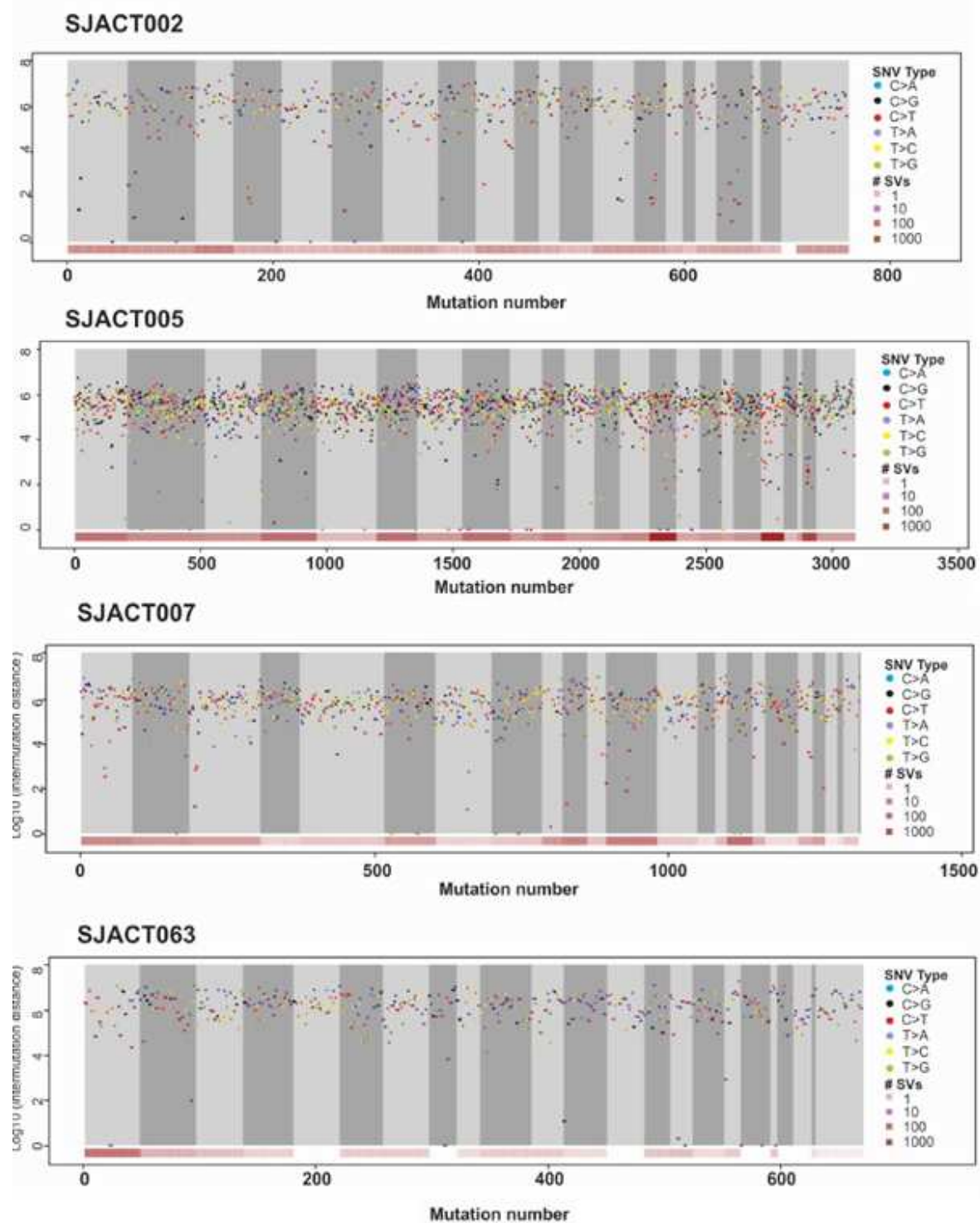


Figura suplementar 10a2

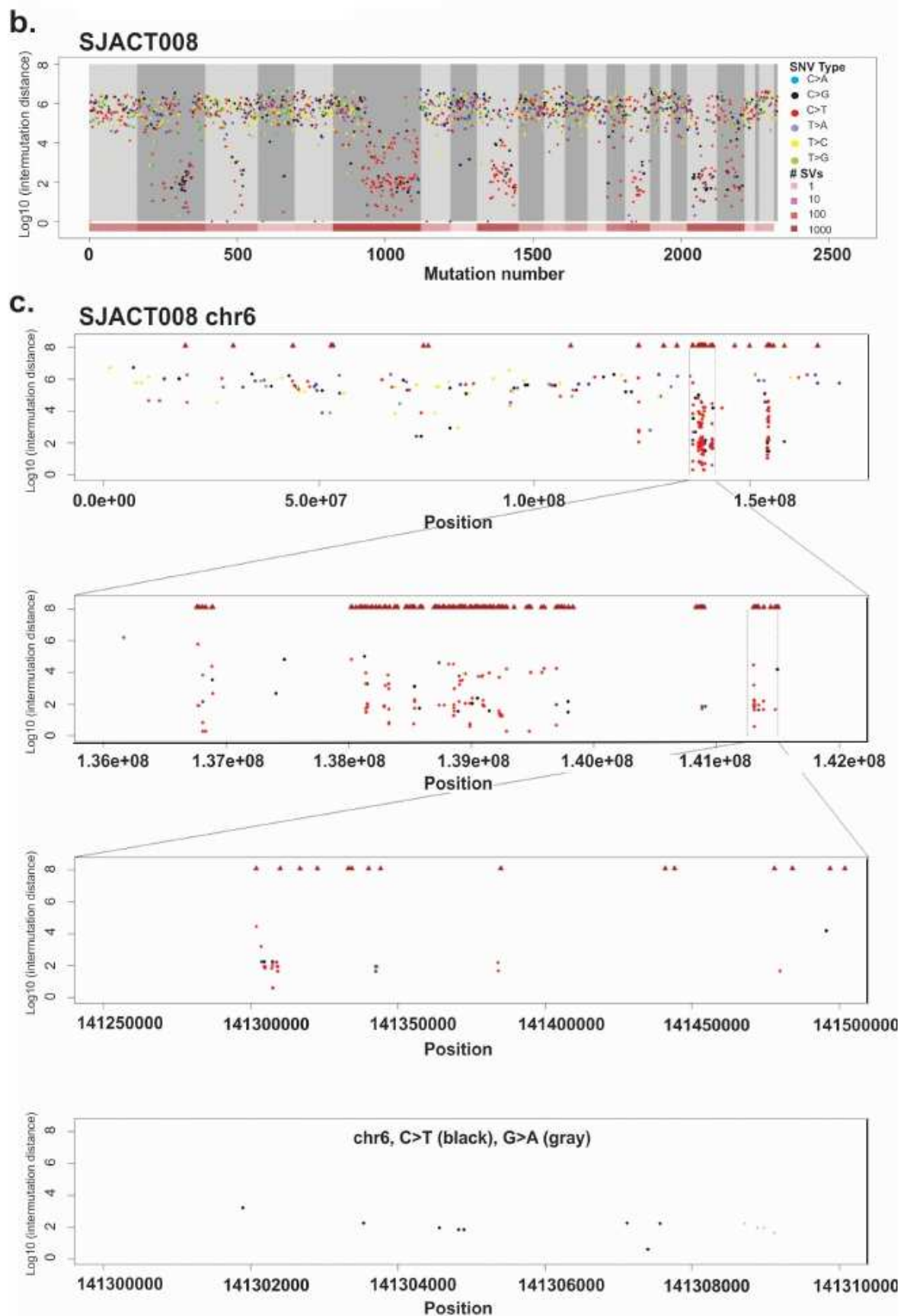


Figura suplementar 10b,c

Figura Suplementar 10 - Assinaturas de kataegis no TCA pediátrico. (a) Plotagens mostrando Log10 da distância intermutação versus o número de mutação por tumores do grupo WGS com pelo menos 500 SNVs validados. SJACT001, SJACT008, SJACT062 e SJACT069 exibiram padrões característicos da kataegis, enquanto os outros quatro casos são negativos. Os restantes 11 casos WGS foram excluídos por falta de SNVs que atingiram o limite para análise. (b) A análise detalhada do SJACT008. Plotagem mostrando o Log10 da distância intermutação versus o número de mutações (painel superior). Os cromossomos são demarcados por tonalidade cinza e o número de SVs em cada cromossomo é mostrado em marrom na parte inferior. SNVs validados são plotados e codificados por cor pelo tipo de mutação. (c) A análise detalhada do cromossomo 6 representativo em SJACT008 mostrando hipermutação baseado nos grupos C> T (pontos vermelhos).

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

Supplementary Table 1a Clinical data for pediatric ACT_WGS cohort

PCGP ID	TP53 status	Gender	Clinical Presentation	Tumor Histology	Age at diagnosis (mo)	Tumor Weight (g)	Stage	Initial Treatment	Tumor spillage	Metastasis	Relapse	Treatment after Relapse	Survival Status	Follow-Up (mo)
1	SJACT001	I32F	F	V	ACC	35.7	1250	III	S	yes	yes	S+C	Alive	95
2	SJACT002	R213Q	F	V+C	ACC	31.5	98.3	III	S	yes	yes	S+C	Alive	111
3	SJACT003	WT	F	V	Undeterm	15.6	28.4	I	S	no	no		Alive	51
4	SJACT004	WT	F	V	ACA	59.8	20.5	I	S	no	no		Alive	50
5	SJACT005	R273C	F	V	ACC	184.7	1052	IV	S	yes	yes	S+C	Died	17
6	SJACT006	WT	F	A	Undeterm	140.6	388	III	S	yes	no		Alive	43
7	SJACT007	T125T	M	V	ACC	103	500	III	S	no	yes	C	Alive	76
8	SJACT008	G245C	M	NF	ACC	136.6	627	III	S+C	no	yes		Died	29
9	SJACT060	R337H	F	V	ACC	38.9	12	I	S	no	no		Alive	51
10	SJACT061	R337H	F	V	ACC	38.5	6	I	S	no	no		Alive	47
11	SJACT062	R337H	F	V	ACC	56.6	260	III	S+C	no	no		Alive	47
12	SJACT063	R337H	F	V	ACC	16.3	68	III	S+C	yes	no		Alive	39
13	SJACT064	R337H	F	V	ACC	35.4	30	I	S	no	no		Alive	37
14	SJACT065	WT	F	C	ACC (BWS)	17.2	120	II	S	no	no		Alive	37
15	SJACT066	R337H	F	V	ACC	19	142	II	S	no	no		Alive	36
16	SJACT068	R337H	F	V	ACC	10.6	330	II	S	no	no		Alive	29
17	SJACT069	R337H	M	V	ACC	53.8	670	II	S	no	yes	S+C	Alive	20
18	SJACT070	R337H	M	V	ACC	9.7	48	I	S	no	no		Alive	30
19	SJACT071	R337H	F	V+C	ACC	17.7	86	III	S+C	no	no		Alive	32

PCGP=Pediatric Cancer Genome Project

WT=Wild type sequence

F=Female, M=Male

V=Virilization, C=Cushing; A=aldosterone-producing, NF=non-functional

ACC=adrenocortical carcinoma, ACA=adrenocortical adenoma, Undeterm=Undetermined malignancy

S=Surgery, C=Chemotherapy

Supplementary Table 1b Clinical data for pediatric ACT _ WES cohort

PCGP ID	TP53 status	Gender	Clinical Presentation	Tumor Histology	Age at diagnosis (mo)	Tumor Weight (g)	Stage	Initial Treatment	Tumor spillage	Metastasis	Relapse	Treatment after Relapse	Survival Status	Follow-up (mo)
1	SJACT009	WT	F	V	ACA (B)	107.5	I	S	no	no	no		Alive	114
2	SJACT010	R196*	M	V	ACC	13.4	III	S+C	no	no	no		Alive	42
3	SJACT012	E285V	M	NF	ACC	17.2	III	S	yes	no	yes	O	Died	5
4	SJACT013	G266E	F	V+C	ACC	15.3	III	S	no	no	no		Alive	71
5	SJACT014	IVS4+1 G>A	F	V+C	ACC	11	III	S	no	no	no		Alive	38
6	SJACT015	V157F	M	V	ACC	22.8	I	S	no	no	no		Alive	33
7	SJACT016	R175H (S)	M	V+C	ACC	15.1	I	S	no	no	no		Alive	77
8	SJACT017	R273C (S)	M	V+C	Undeterm	24.1	I	S	no	no	no		Alive	26
9	SJACT018	V218M	F	V	ACC	13.9	II	S	NA	no	yes	S+C	Alive	16
10	SJACT019	WT	F	V	ACC	108	III	S+C	yes	no	yes	S+C	Died	42
11	SJACT020	WT	F	V	Undeterm	26.2	III	S	yes	no	no		Alive	78
12	SJACT021	Hom del (S)	M	C	ACC	156.6	IV	S+C	no	yes	yes	S+C	Died	38
13	SJACT022	WT	F	NF	ACC	88.7	III	S+C	yes	no	no		Alive	26
14	SJACT023	WT	F	NF	ACC	182.1	NA	S	NA	no	yes	S+C	Alive	20
15	SJACT024	IVS10-2 A>G	F	V+C	Undeterm	34	I	S	no	no	no		Alive	47
16	SJACT025	c.933 ins A	F	V	ACA	13.7	NA	S	NA	no	no		Alive	1
17	SJACT026	R337H	M	V	ACC	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA	NA
18	SJACT027	R337H	M	V+C	ACC	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA	NA

PCGP=Pediatric Cancer Genome Project

S=Somatic, Hom del=Homozygous deletion, WT=Wild type sequence

F=Female, M=Male

V=Virilization, C=Cushing; A=aldosterone-producing, NF=non-functional

ACC=adrenocortical carcinoma, ACA=adrenocortical adenoma, Undeterm=Undetermined malignancy, B=Bilateral

NA=not available.

S=Surgery, C=Chemotherapy, O=observation

Supplementary Table 1c Clinical data for pediatric ACT₁ Validation cohort

IPACTR ID	TP53 status	Gender	Clinical Presentation	Tumor Histology	Age at diagnosis (mo)	Tumor Weight (g)	Stage	Initial Treatment	Tumor Spillage	Metastasis	Relapse	Treatment after Relapse	Survival Status	Follow-up (Mo)
IPACTR001	c.134_135 ins T (S)	F	V+C	ACC	98.6	117	IV	S+C	no	yes	yes	S+C	Died	36
IPACTR002	WT	F	V	ACC	17.2	280	III	S	yes	no	no	S+C	Alive	36
IPACTR003	R337H	F	V	ACC	57	2460	III	S+C	yes	no	yes	Obs	NA	16
IPACTR004	WT	M	V	ACC	8	NA	IV	S+C	yes	yes	NA	Obs	NA	NA
IPACTR005	K305*	F	NF	ACC	35	NA	III	S	no	no	NA	C	Died	11
IPACTR006	WT	M	NF	ACC	204	625	IV	S+C	no	yes	NA	C	Died	4
IPACTR007	WT	M	V	ACC	36	578	IV	S+C	no	yes	yes	C	Alive	16
IPACTR008	R282W	F	V+C	ACA	6.7	193	III	S	no	no	no	C	Alive	10.6
IPACTR009	R337H	M	V	ACC	37.2	1155	III	S	yes	no	yes	C	Alive	0
IPACTR010	R248W	F	V	ACC	16.9	NA	I	S	no	no	no		Alive	43.4
IPACTR011	c.51_53 delCAATinsGACCTG	F	A	Undeterm	189.7	52	III	S+C	no	no	no		Alive	12.9
IPACTR012	c.108_110 duplGTTTC	F	V	ACC	25	15	I	S	no	no	no		Alive	9.7
IPACTR013	R273H (S)	F	V	Undeterm	94	92	I	S	no	no	no		Alive	24
IPACTR014	WT	F	NF	ACC	159	2180	IV	S+	no	yes	NA		Died	13
IPACTR015	R337H	M	V	ACC	34	125	I	S	no	no	yes	C	Alive	34
IPACTR016	WT	F	V	Undeterm	6	NA	II	S	no	no	no		Alive	24
IPACTR017	R175H	F	V+C	ACC	144	256	II	S+C	no	no	yes	S	Alive	38
IPACTR018	R158H	F	V+C	ACC	7	62.9	I	S	no	no	no		Alive	31
IPACTR019	E180K (S)	F	NF	ACC	11	30	I	S	no	no	yes	S+C	Alive	36
IPACTR020	WT	F	C	ACC	6	149	II	S	no	no	no		Alive	17
IPACTR021	WT	F	NF	ACC	53	515	III	S+C	no	no	no		Alive	12
IPACTR022	WT	M	V	ACA	15	62	I	S	no	no	no		Alive	12
IPACTR023	WT	F	C	ACA	51.7	169	I	S	no	no	no		Alive	84
IPACTR024	WT	F	V	ACC	47	4.6	I	S	no	no	no		NA	NA
IPACTR025	WT	M	V+C	ACC	40.7	144	II	S+C	no	no	NA		NA	NA
IPACTR026	WT	F	C	ACA	3	172	II	S	no	no	no		Alive	12
IPACTR027	WT	M	V	ACC	93	250	II	S+C	yes	no	no		Alive	12
IPACTR028	WT	M	NF	ACC	27.8	56	IV	S	no	yes	no	Rad	Alive	36
IPACTR029	WT	F	NF	ACC	88.7	60	III	S+C	yes	no	yes		Alive	36
IPACTR030	WT	F	C	ACC	25	2092	IV	S+C	no	yes	NA		Died	5
IPACTR031	WT	F	C	ACA	124	60	I	S	NA	NA	NA		Died*	0.2
IPACTR032	WT	F	C	Undeterm	22	138	II	S	no	no	no		Alive	12
IPACTR033	WT	F	V+C	ACC	8	118	II	S	no	no	no		Alive	22
IPACTR034	T125M	M	V+C	ACC	14	52	I	S	no	no	no		Alive	5

IPACTR= International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry

S=Somatoc, WT=Wild type sequence

F=Female, M=Male, V=Virilization, C=Cushing, A=aldosterone-producing, NF=non-functional

ACC=adrenocortical carcinoma, ACA=adrenocortical adenoma, Undeterm=Undetermined malignancy

NA=not available.

S=Surgery, C=Chemotherapy, Obs=observation, Rad=Radiation

Supplementary Table 2a Coverage data for WGS cohort

Patient	G/D	% Reads Mapped	Nucleotides Sequenced	Genome Coverage	Exon Coverage	% Genomic bases covered	% Exonic bases covered	% Coding bases covered	% SNP Detection
SJACT001	D	95.6	15898437200	41.4	39.7	99	98	98	99.23
SJACT001	G	95.22	12404392600	34.4	32.4	99	98	98	99.22
SJACT002	D	94.49	14823734800	37.3	34.4	98	96	96	99.38
SJACT002	G	95.31	11759178500	33.9	30.6	99	96	96	99.51
SJACT003	D	95.49	12070789600	30.9	29.1	98	95	95	98.89
SJACT003	G	95.63	11363274100	31.9	30.4	99	96	96	99.54
SJACT004	D	93.28	14725671200	34.6	31.4	99	96	96	98.52
SJACT004	G	90.69	12052449600	31.2	27	98	89	87	97.96
SJACT005	D	94.71	12470130000	33.2	31.7	98	97	97	99.01
SJACT005	G	95.35	11169692500	30.1	28.5	99	98	98	99.55
SJACT006	D	95.33	21431358500	62.7	54.5	99	95	95	99.54
SJACT006	G	95.82	12758736000	37	33.1	99	93	92	99.56
SJACT007	D	94.7	17971515800	48.9	43.5	98	93	92	99.51
SJACT007	G	95.35	10324556800	29.6	26	98	89	88	99.51
SJACT008	D	94.02	18677432800	50.9	44.3	99	92	91	99.35
SJACT008	G	94.86	10416142200	29.4	27.2	98	92	92	99.55
SJACT080	D	94.55	21776763500	61.9	56.4	98	97	97	99.58
SJACT080	G	94.66	13010643700	38.8	34.5	98	94	94	99.55
SJACT081	D	91.74	18501575500	51.9	47	98	96	96	99.51
SJACT081	G	92.28	12427944800	36.6	32.4	98	93	93	99.5
SJACT082	D	88.47	21947750000	56.9	51.1	98	96	96	99.56
SJACT082	G	93.95	12491029800	36.9	31.8	98	95	95	99.55
SJACT083	D	92	20694687900	57	52.2	98	96	96	99.58
SJACT083	G	94.07	12921386800	38.3	34.9	98	96	96	99.59
SJACT084	D	92.61	22480798500	62.1	56.7	98	97	97	99.55
SJACT084	G	93.67	13570801800	40	35.1	98	97	97	99.57
SJACT085	D	93.72	16714620500	47.3	42.9	98	97	97	99.58
SJACT085	G	95.59	14491998500	31.1	26.1	98	94	94	99.56
SJACT086	D	91.2	17808127600	47.4	37.6	98	96	96	99.38
SJACT086	G	93.57	10670105600	31.2	29.4	97	96	96	99.5
SJACT088	D	91.15	18989264000	53.4	48.4	98	98	98	99.5
SJACT088	G	84.34	11732905200	32.4	29.3	98	97	97	99.5
SJACT089	D	92.49	20593357800	54.4	50.8	99	96	96	99.31
SJACT089	G	94.11	12401621600	36.6	33	99	96	96	99.53
SJACT070	D	93.6	20007933600	56.7	51.7	99	95	95	99.33
SJACT070	G	93.91	12144212900	35.9	32.6	99	94	94	99.49
SJACT071	D	89.9	19857085100	53.7	48.8	98	96	96	99.47
SJACT071	G	91.2	11796240500	33.6	30.1	98	94	94	99.5

D=Diagnosis sample (tumor), G=germline sample
 SNP= single nucleotide polymorphism

Supplementary Table 2b Coverage data for WES cohort

Patient	D/G	Nucleotides Sequenced	% Reads Mapped	Duplication Rate	% Covered Coding Bases >= 10x	% Covered Coding Bases >= 20x	% Covered Coding Bases >= 30x
SJACT009	D	15043256600	98	21	93.6	90.1	85.8
SJACT009	G	12438324200	99	21	92.4	87.7	82.5
SJACT010	D	9318615200	98	18	86.8	78.2	69.4
SJACT010	G	13728257000	99	21	92.5	88.3	83.5
SJACT012	D	19698081800	98	22	94.2	91.3	87.9
SJACT012	G	13877013000	99	20	92.6	88.2	83.6
SJACT013	D	12866056600	97	22	91.6	85.9	79.3
SJACT013	G	12193565800	98	20	91.8	86.5	80.8
SJACT014	D	10917198800	98	18	92.3	87.0	80.6
SJACT014	G	14297086600	98	20	93.7	90.2	86.2
SJACT015	D	14368568200	97	20	93.0	88.6	83.5
SJACT015	G	14743645400	98	20	93.6	89.8	85.8
SJACT016	D	11516477400	99	26	91.7	85.1	77.5
SJACT016	G	9008140000	98	26	88.8	79.7	69.8
SJACT017	D	11667485200	98	26	91.6	85.1	77.1
SJACT017	G	12064808000	99	26	92.7	87.3	81.1
SJACT018	D	14950457800	98	26	93.2	89.1	84.4
SJACT018	G	13222830800	99	26	93.5	89.2	84.2
SJACT019	D	14806895400	99	30	91.6	85.9	79.9
SJACT019	G	13382702000	99	30	91.7	85.8	79.4
SJACT020	D	13612409800	98	29	93.1	88.4	82.8
SJACT020	G	10475897800	99	30	87.3	78.4	69.9
SJACT021	D	11605488000	98	28	90.4	83.2	74.9
SJACT021	G	13781778000	98	29	93.2	88.5	82.5
SJACT022	G	11212136000	99	27	91.8	86.0	79.2
SJACT022	R	15765577000	99	27	94.2	90.9	87.2
SJACT023	D	11508317600	98	26	92.1	86.4	79.9
SJACT023	G	15080363600	99	29	93.2	88.9	84.2
SJACT024	D	14039062200	98	28	92.3	87.3	81.4
SJACT024	G	11570355000	99	26	91.9	86.2	79.8
SJACT025	D	8158218800	99	22	89.7	81.0	70.7
SJACT025	G	10743766000	99	23	92.5	87.2	80.7
SJACT026	D	8994594600	97	22	89.2	78.7	66.6
SJACT026	G	9154829000	97	23	86.2	76.9	67.0
SJACT027	D	7224613200	96	23	83.0	69.9	56.8
SJACT027	G	4000300000	97	22	65.7	44.5	29.4

D= Diagnosis sample (tumor), G= Germline

Supplemental Table 2c Coverage analysis for RNASeq in the WGS cohort and normal samples

Patient	D/G	Nucleotides Sequenced	% Reads Mapped	% Dup	% Covered Bases >= 10x	% Covered Bases >= 20x	% Covered Bases >= 30x
SJACT001	D	23270039200	72	19	64.5	56.5	50.9
SJACT002	D	12696074800	68	25	54.1	44.2	37.7
SJACT003	D	12320771000	78	28	53.5	43.6	37.2
SJACT004	D	12883935400	79	40	52.0	41.5	34.6
SJACT005	D	3410950000	93	12	41.4	29.3	22.3
SJACT006	D	12723336200	97	16	65.1	57.8	52.4
SJACT007	D	13409165800	97	50	53.7	43.3	36.5
SJACT008	D	48216816800	80	35	73.4	67.6	63.5
SJACT060	D	8548055200	97	24	52.7	42.0	35.4
SJACT061	D	10048473800	98	19	61.2	51.2	44.5
SJACT062	D	10912405800	97	20	56.6	47.3	41.2
SJACT063	D	8616942200	98	18	54.7	44.8	38.4
SJACT064	D	9706920000	98	16	59.4	49.9	43.5
SJACT065	D	10059846800	97	22	60.2	51.4	45.2
SJACT066	D	10841827800	98	15	61.6	52.2	45.8
SJACT071	D	11180247600	98	20	60.8	51.0	44.3
C1	G	7795391200	99	18	57.3	46.7	39.6
C2	G	8864573000	98	27	50.7	40.2	33.9
C3	G	7853147800	99	13	60.8	49.8	42.4
C4	G	11428112400	98	34	55.9	44.7	37.5
C5	G	9209946200	99	24	57.7	46.2	38.7
C6	G	11059529200	99	27	58.3	48.1	41.1

D= Diagnosis sample (tumor), G= Germline

Supplementary Table 3c Validated coding region indels in the WGS and WES cohorts

Sample	Gene	protein_gi	variant	chr	pos	class	flanking_region_5	flanking_region_3	Non-ref		Ref Allele	Counts	Origin	Validation status
									Allele	Counts				
SIAC001_D	FMN3	119120874	FMN3_C537T	12	50045226	FRAMESHIFT	GGGCTGGGG	CACCTGTCTG	A	-	SOMATIC	VALID		
SIAC002_D	ATG2A	239047271	ATG2A_M412T	11	64678740	FRAMESHIFT	GGTTGGGGGG	ATCTTGCCCTG	C	-	SOMATIC	VALID		
SIAC002_D	D5G1	119703744	D5G1_F803T	18	28934567	FRAMESHIFT	TCGCCACATT	CGGCACCTACC	T	-	SOMATIC	VALID		
SIAC003_D	CTNNB1	4503131	CTNNB1_S45>VTAP5	3	41266137	PROTEININS	ACAGCTCCTT	CTCTGAGTGG	-	ACACAGCTCCTT	SOMATIC	VALID		
SIAC005_D	UNKL	301129263	UNKL_R62>T	16	1463948	FRAMESHIFT	GGGCGCTGG	CGCGCTGGT	G	-	SOMATIC	VALID		
SIAC005_D	D5K1	4756156	D5K1_A990T	7	137082135	FRAMESHIFT	TTCACGTGCT	CCATATCCAA	G	-	SOMATIC	VALID		
SIAC005_D	ZFXH4	291167749	ZFXH4_T128_G129T	8	77616707	FRAMESHIFT	AAAACTCTAAC	GGGAGATGCT	AG	-	SOMATIC	VALID		
SIAC005_D	TBC1D12	146806902	TBC1D12_E63_T64T	10	96162559	FRAMESHIFT	AGGAGGAGGA	CGCGCGCTGG	GA	-	SOMATIC	VALID		
SIAC006_D	PODXL	66277202	PODXL_I74_L75T	7	131196070	FRAMESHIFT	ACCGAGGCCA	TTGCTTGCC	AGAT	-	SOMATIC	VALID		
SIAC060_D	LARP4B	57634536	LARP4B_T163T	10	890938	FRAMESHIFT	GAATTCCAAT	TTTTTTTAAG	G	-	SOMATIC	VALID		
SIAC060_D	ZNF787	152963637	ZNF787_D363del	19	56599452	PROTEINDEL	CGTGTGCTGC	CTCTCTCTCC	GTC	-	SOMATIC	VALID		
SIAC063_D	TTL	24308516	TTL_G50T	2	113240071	FRAMESHIFT	TGCGCTTCGG	AGACTGGGTG	G	-	SOMATIC	VALID		
SIAC069_D	SYTL2	46255062	SYTL2_L821T	11	85431966	FRAMESHIFT	ACTCTTTCG	AGTTTTCAAA	AA	-	SOMATIC	VALID		
SIAC069_D	ARFGAP2	31543983	ARFGAP2_A2T	11	47198399	FRAMESHIFT	TGGGCTCCGC	GCCATTTTCT	C	-	SOMATIC	VALID		
SIAC070_D	DOK5	29544726	DOK5_R115_N117T	20	53205279	FRAMESHIFT	TGTAGGAACA	ATGACATCAG	CGGATCA	-	SOMATIC	VALID		
SIAC009_D	CYP17A1	4503195	CYP17A1_D155T	10	104594743	FRAMESHIFT	TGGCCAGCAT	ATCACACAAT	T	-	SOMATIC	VALID		
SIAC010_D	DNAJC18	22749377	DNAJC18_N161T	5	130761930	FRAMESHIFT	CCTGTAAATG	TTATAAGGTC	A	-	SOMATIC	VALID		
SIAC012_D	C11ORF9	188528652	C11orf9_Q832T	11	61548439	FRAMESHIFT	CAGGTCCAGC	AGAGCTTTGG	C	-	SOMATIC	VALID		
SIAC012_D	CYP11B1	61743918	CYP11B1_R412T	8	143956536	FRAMESHIFT	GGCGGGGTTG	ACCCAGAGAG	CG	-	SOMATIC	VALID		
SIAC012_D	MAP1B	153945728	MAP1B_S1631T	5	71494074	FRAMESHIFT	ACTGCAAGAT	AGGACACCGC	CC	-	SOMATIC	VALID		
SIAC012_D	MTH3	98306453	MTH3_K1110T	17	10542201	FRAMESHIFT	TGCAACTCTT	GATTTTCTTC	T	-	SOMATIC	VALID		
SIAC012_D	LTN1	231573214	LTN1_V268T	21	30353586	FRAMESHIFT	TACAACCCGG	AGAATTTAGC	T	-	SOMATIC	VALID		
SIAC012_D	CNTN3	75709104	CNTN3_G15T	3	74570219	FRAMESHIFT	CTCTTAAGCA	CCAATGAATG	G	-	SOMATIC	VALID		
SIAC012_D	HSD17B2	4504503	HSD17B2_L67T	16	82069228	FRAMESHIFT	GTCATGCTTC	TCATGTATAC	C	-	SOMATIC	VALID		
SIAC012_D	ANXA4	4502105	ANXA4_K71T	2	70033537	FRAMESHIFT	ACGACTGAA	TCAGAACTGA	G	-	SOMATIC	VALID		
SIAC012_D	PPP1R15A	157674363	PPP1R15A_E261T	19	49377272	FRAMESHIFT	AGGTCTGGG	AGTATGTTCT	-	T	SOMATIC	VALID		
SIAC012_D	COL4A3	89142730	COL4A3_G910T	2	220140554	FRAMESHIFT	TGGGAACCCA	GGCACACCAG	-	A	SOMATIC	VALID		
SIAC012_D	DOCK9	194239705	DOCK9_V1114T	13	99515749	FRAMESHIFT	AACAGTCCCA	CCAAGAAGTG	-	A	SOMATIC	VALID		
SIAC012_D	SLC26A8	301601599	SLC26A8_G873T	6	35911972	FRAMESHIFT	TAGGTCGAGA	CCGCGCCAGC	-	A	SOMATIC	VALID		
SIAC019_D	VWA38	118918435	VWA38_P262T	2	98744784	FRAMESHIFT	TTGGAGATCC	GTGTCCAGTC	C	-	SOMATIC	VALID		
SIAC019_D	NACA	163965366	NACA_V212_V214T	12	57114672	FRAMESHIFT	TCACACATG	ACAGTACTGA	GTAAGGA	-	SOMATIC	VALID		
SIAC023_D	CNTN3	75709104	CNTN3_N90T	3	74535697	FRAMESHIFT	CAATTTCTGT	GGGATTAAAT	T	-	SOMATIC	VALID		
SIAC024_D	FOSL2	4885245	FOSL2_P200_R210T	2	28834958	FRAMESHIFT	GGCTGCAGCC	AGTGGGGGTG	CATGGCC	-	SOMATIC	VALID		

Chr=chromosome, pos=position

Supplementary Table 4 Functional fusion genes detected in RNAseq

Sample ID	Genes	RNA	chrA	RNA	posA	RNA	chrB	RNA	posB	RNA	onB	RNA	chrA	DNA	posA	DNA	oriA	DNA	chrB	DNA	posB	DNA	oriB	DNA	Type	DNA
SJACT001_D	ABO_FAM171A1	9			136150578	-		10	15326105	-			10		15411941		+		9		136138871		+		CTX	
SJACT001_D	NEB_CACNB4	2			152534092	-		2	1.53E+08	-			2		152944437		+		2		152534090		+		INS	
SJACT005_D	CATSPERG CHST8	19			38835009	+		19	34282882	+			19		38837248		+		19		34282719		+		INS	
SJACT005_D	MCM5_FSD1	22			35817455	+		19	4317176	+			22		35817475		+		19		4318896		+		CTX	
SJACT008_D	CTPS2 PCP4L1	X			16711264	-		1	1.61E+08	+			X		16708770		-		1		161243452		+		CTX	
SJACT008_D	DDX50_STOX1	10			70679738	+		10	70652347	+			10		70680381		+		10		70645596		+		INS	
SJACT008_D	POLR3B_TCP11L2	12			106763461	+		12	1.07E+08	+			12		106769291		+		12		106716353		+		INS	
SJACT008_D	ARID3B RORA	15			74836829	+		15	61077370	-			15		61079014		+		15		60911049		-		ITX	
SJACT060_D	PPTC7_LUPF	12			111020613	-		10	80428319	+			15		45487853		+		12		111018685		+		CTX	
SJACT060_D	PPTC7_LUPF	12			111020613	-		10	80428319	+			15		45487387		-		10		80427947		+		CTX	
SJACT062_D	C10orf10 ATG2A	19			4669506	-		11	64662381	-			11		64662702		+		19		4668167		+		CTX	
SJACT069_D	FHOD3_L2HGDI	18			34205713	+		14	50713971	-			14		49840099		+		18		34230617		-		CTX	

Chr = chromosome; pos = position; ori = strand orientation; CTX = interchromosomal translocation; INS = tandem duplication; ITX = intrachromosomal translocation; RNA = translocation information in RNA-seq; DNA = translocation information in WGS; a = breakpoint A; b = breakpoint B

